



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Politècnica Superior d'Enginyeria
de Manresa



Treball de Fi de Carrera

***Caracterització de
biopel·lícules
mitjançant la utilització de
microsensores.***

Memòria

Nom:	Daniel Rodríguez Ruiz
Titulació:	Grau en Enginyeria Química
Convocatòria:	Juny 2015
Tutors:	Antonio David Dorado Castaño / Xavier Guimerà Villalba



Escola Politècnica Superior
d'Enginyeria de Manresa

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

NORMATIVA DEL TFG DE L'EPSEM

Emplenar per l'estudiant/a

ANNEX 1.- AUTORITZACIÓ DE LA MATRÍCULA DEL TFG EN MODALITAT A o B

ESTUDIANT/A: Daniel Rodríguez Ruiz **Núm. Identificatiu** 39388668-H
GRAU EN: Enginyeria Química
DIRECTOR/A DEL TFG: Antonio David Dorado Castaño / Xavier Guimerà Villalba
DEPARTAMENT: Recursos Naturals
REALITZACIÓ EN ANGLÈS: Sí No
MODALITAT: A

TÍTOL: Caracterització de biopel·lícules mitjançant la utilització de microsensores.

DESCRIPCIÓ:

Els estudis centrats en la caracterització de biopel·lícules són limitats per la dificultat de fer mesures en els reduïts gruixos que aquestes presenten, que normalment oscil·len entre els centenars de micròmetres i els pocs mil·límetres. Els microsensores han demostrat ser una eina molt útil que permet mesurar a l'interior de biopel·lícules amb una resolució espacial adient a les seves dimensions. L'objectiu d'aquest treball serà l'estudi de biopel·lícules de diferent naturalesa a partir de l'obtenció de perfils de concentració, estudiant el comportament en front de diferents espècies. L'anàlisi d'aquests resultats permetrà aprofundir en el coneixement de l'estructura i funcionament dels sistemes biològics aplicats al tractament de gasos.

SOL·LICITUD PER A SER AVALUAT DE LES COMPETÈNCIES GENÈRIQUES EN NIVELL 3 (si no estan assolides)		Sí	No
1.- Emprenedoria i innovació			x
2.- Sostenibilitat i compromís social			x
3.- Tercera Llengua			x
4.- Comunicació eficaç oral i escrita			x
5.- Ús solvent dels recursos d'informació			x
6.- Aprenentatge autònom			x
7.- Treball en equip			x

Director/a
(si s'escau)

Co-director/a

Estudiant/a

Signatura

Signatura

Signatura

Data Registre : _____ (validesa: un any des de la data del registre)

3 Exemplars: Director/a / Secretaria de l'Escola / Estudiant/a per incorporar al TFG

* Normativa Transitòria fins que l'aplicatiu PRISMA permeti la gestió telemàtica del TFG
(Document aprovat per la Comissió Permanent de 5 de juliol de 2012, i per la Junta de Centre de 12 de juliol de 2012)

Agraïments

Primer de tot, he de dir que estic molt agraït a en Xavier Guimerà per la seva ajuda durant tots aquests mesos en els que hem estat realitzant el projecte, on gràcies a ell he après molt sobre la temàtica del projecte. Sense ell hagués estat impossible haver realitzat aquest treball.

De la mateixa manera, volia agrair a en Antonio David Dorado, la confiança que va dipositar en mi quan em va oferir la oportunitat d'acceptar aquest projecte i per als seus consells durant aquest.

Segonament, donar les gràcies a la gent que treballava al laboratori, on sempre que he necessitat ajuda me l'han ofert desinteressadament.

Finalment, agrair als familiars i amics el seus ànims i suport continu que han estat de gran ajuda per tirar endavant el projecte.

Abstract

The biological techniques have acquired a lot of importance in the elimination of pollutants. The fundamental part of the biological techniques is the elimination of the contaminants with the microorganisms. These microorganisms grow in the biofilters creating a biofilm, which is the most essential part of this type of technique, where all processes of elimination take part. To maximize the advantages offered by this biofilm the affected parameters have been studied, where the oxygen is one of the most important in the aerobic processes as an oxidant agent in most of the reactions inside it. The diffusion of the oxygen is key parameter to determine the inside effect of the biofilm depending on the environment condition at the moment of measurement, either it is on endogenous state or with load of substrate, the aerobic or anaerobic system zone change. Knowing the concentrations of oxygen we can modelling the biofilm to know more about the mass transfer and biokinetic (the reactions as a consequence of the metabolic activity of the microorganisms). To obtain the dissolved oxygen data in the biofilm in laboratory-scale, the researching staff has developed advanced microsensors which permit to do profiles inside the biofilms without damaging the system, permitting get the chemical parameters we want for the biofilm treatment and also have a good resolution when getting measurements. The most used are the Clark type, its function is to detect the dissolved oxygen in the biofilm. Although, now a new technology called MEMS, which supplies the dynamic limitations of the Clark, has been developed.

The aim of this study is to develop a methodology which allows characterising all types of biofilms. To do this, the use of microsensors capable of measuring inside it, in a laboratory-scale system, is necessary. The study of diverse parameters which might affect the oxygen transfer, with the obtained data and different microsensors, we can determine characteristic parameters defining the biofilm process.

Resum

Les tècniques biològiques han adquirit molta importància en quant a la eliminació de contaminants. La part fonamental de les tècniques biològiques és la eliminació dels contaminants a través de microorganismes. Aquests microorganismes creixen en els biofiltres creant una biopel·lícula que és la part més essencial d'aquest tipus de tècniques, ja que és on tenen lloc tots els processos d'eliminació. Per poder aprofitar al màxim els avantatges que ens ofereix aquesta biopel·lícula s'ha mirat d'estudiar els paràmetres que li afecten, on l'oxigen és un dels més importants quan es tracta de processos aerobis on apareix com a agent oxidant en moltes de les reaccions que hi tenen lloc en el seu interior. La difusió del oxigen, és un paràmetre clau per determinar el seu efecte en l'interior de la biopel·lícula, ja que depenent de les condicions del medi en les que es trobi, sigui en estat endogen (sense substrat) o amb càrrega de substrat, les zones aeròbies i anaeròbies del sistema varien. Sabent les concentracions de l'oxigen podem modelitzar la biopel·lícula per esbrinar més sobre la transferència de matèria i sobre la biocinètica (són les reaccions que tenen lloc com a conseqüència de l'activitat metabòlica dels microorganismes). Per aconseguir les dades de l'oxigen dissolt en la biopel·lícula a escala laboratori, el grup de recerca ha desenvolupat uns microsensores molt avançats que permeten fer perfils al interior a la biopel·lícula d'una manera poc invasiva, els quals ens permeten obtenir els paràmetres químics que desitgem pel tractament de les biopel·lícules i, a més a més, tenen una bona resolució a l'hora d'obtenir les mesures. Els més utilitzats són els de tipus Clark, on la seva funció es detectar l'oxigen dissolt en la biopel·lícula. Encara que actualment s'ha desenvolupat una tecnologia nova anomenada MEMS, que supleixen les limitacions dinàmiques dels Clark i que en aquest treball s'evidencien.

L'objectiu del present treball és desenvolupar una metodologia que permeti caracteritzar tot tipus de biopel·lícules. Per dur-lo a terme, necessitarem la utilització de microsensores que siguin capaços de mesurar dins de les biopel·lícules, en un sistema a escala laboratori. S'estudia l'efecte de diversos paràmetres que podrien afectar a la transferència de l'oxigen i mitjançant les dades obtingudes amb els diferents microsensores, podrem determinar paràmetres característics que defineixen el comportament de la biopel·lícula.

Índex

Abstract	7
Resum	8
Índex.....	9
1. Abreviatures i símbols.....	12
2. Antecedents i objectius	13
3. Introducció	16
3.1 Contaminació atmosfèrica	16
3.2 Tractament dels contaminants gasosos i olors	18
3.3 Tècniques per al tractament biològic de gasos	19
3.3.1 Biofiltres convencionals	19
3.3.2 Biolfiltre percolador de tractament de gasos	20
3.4 Biopel·lícula	21
3.4.1 Fonaments	21
3.4.2 Creixement de la biopel·lícula.....	22
3.4.3 Caracterització de les biopel·lícules.....	24
3.4.4 Tipus de biopel·lícula.....	25
3.5 Procés d'eliminació dels contaminants en la biopel·lícula	26
3.5.1 Transferència de matèria.....	26
3.5.2 Transferència entre fases de la biopel·lícula.....	28
3.5.3 Biocinètica	30
3.6 Selecció del sistema d'estudi per a la caracterització de les biopel·lícules ...	31
3.7 Microsensores	32
3.7.1 Microsensores electroquímics o de tipus Clark d'oxigen	32
3.7.2 Microsensores Clark de pH.....	35
3.7.3 Microsensores Clark de sulfur	36
3.7.4 Microsensores tipus MEMS	37
4. Materials i mètodes.....	39
4.1 Microsensores	39

4.1.1	Microsensor OD.....	39
4.1.2	Microsensor de pH.....	39
4.1.3	Microsensor de referència	39
4.1.4	Microsensor MEMS	39
4.1.5	Sensor DUMMY	40
4.2	Preparació dels microsensores.....	40
4.2.1	Activació dels microsensores tipus Clark	40
4.2.2	Activació i protecció dels microsensores MEMS	41
4.2.3	Calibratge dels microsensores.....	44
4.3	Sistema experimental per al cultiu	49
4.3.1	Descripció dels reactors	49
4.3.2	Biomassa utilitzada.....	52
4.3.3	Medi mineral	53
4.4	Procediment a seguir per a la mesura amb microsensores.....	54
4.4.1	Micromanipulador	54
4.4.2	Sistema electrònic	54
4.4.3	Mesura de perfils de concentració	61
4.5	Simulació a partir del model de la biopel·lícula	63
4.6	Mètode per a la determinació de la biocinètica i el càlcul de la biomassa	64
4.7	Determinació de paràmetres.....	67
5.	Resultats.....	68
5.1	Monitorització de la biopel·lícula amb microsensores Clarks	68
5.1.1	Caracterització de la biopel·lícula	68
5.1.2	Estudi de la dinàmica de la biopel·lícula	76
5.1.3	Estudi de la influència de cabals a la biopel·lícula	87
5.2	Monitorització de la biopel·lícula amb microsensores MEMS.....	88
5.3	Estudi cinètic de la biopel·lícula	94
6.	Conclusions	105
7.	Treball futur	108

Referències	109
Apèndix 1: Perfils per a la identificació de les diferents fases del reactor.....	112
Apèndix 2: Perfils per a la determinació de la biopel·lícula aeròbia.....	118
Apèndix 3: Models de l'activitat de la biopel·lícula	122
Apèndix 4: Taules per a la caracterització del sistema.....	124
Apèndix 5: Gràfics de la profunditat total.....	127
Apèndix 6: Gràfics del percentatge del gruix aeròbic de la biopel·lícula	130
Apèndix 7: Perfils realitzat per a l'estudi cinètic.....	132
Apèndix 8: Calibratge de bombes	134

1. Abreviatures i símbols

Símbol	Nom	Unitats
X	Concentració de biomassa	g SSV/L
μ	Velocitat específica de creixement de la biomassa	S^{-1}
μ_{max}	Velocitat màxima de creixement de la biomassa	S^{-1}
KL	Coeficient de transferència de matèria global al líquid	S^{-1}
K_La	Coeficient de transferència de matèria volumètric	mg/l
K	Coeficient de determinació de l'activitat metabòlica	S^{-1}
K_{s1}	Constant de velocitat mitja per a l'oxigen	g OD/L
K_{s2}	Constant de velocitat mitja per a la glucosa	g Glucosa/L
K_d	Consum oxigen en estat endogen	mgOD/mgSSV·s
D	Coeficient de difusió	cm ² /s
q_o	Creixement de la biomassa corregida	mgOD/mgSSV·s
$q_{o,max}$	Velocitat màxima de creixement de la biomassa corregida	mgOD/mgSSV·s
$Y_{X/O}$	Coeficient de rendiment	g cèl·lules formades/ g oxigen consumit
C_s o S_i	Concentració de saturació del solut al líquid	g/l
OD	Oxigen dissolt	mg/l

Abreviatura	Nom
MEMS	Microelectromechanical systems
DO-MEA	Microelectrical array d'oxigen dissolt
COV	Compost orgànic volàtil
DNA	Àcid desoxiribonucleic
OTR	Transferència d'oxigen
OUR	Consum d'oxigen
EDAR	Estació depuradora d'aigües residuals
CV	Voltametria cíclica

2. Antecedents i objectius

Un dels problemes que tenim en el nostre entorn és la contaminació atmosfèrica. Afortunadament, hi ha moltes formes per poder tractar aquest problema, com el tractament biològic és una de les opcions més netes i innovadores.

El funcionament de les biopel·lícules és molt complex i per tal de poder especificar el seu funcionament s'ha realitzat varies investigacions experimentals amb aquestes, derivant a obtenir models on es vegi el mecanisme que hi té lloc en el seu interior (Yurt et al. 2003; Mudliar et al. 2008), per una altra banda la possibilitat de la utilització de microsensores que puguin introduir-se dins de la biopel·lícula i realitzar mesures per determinar diferents paràmetres per poder comprendre com funcionen les biopel·lícules (Revsbech & Jorgensen 1986; Horn & Hempel 1997). Tanmateix, amb aquests mètodes queden incògnites referents a les biopel·lícules, degut a la diversitat de fenòmens que succeeixen en aquestes i les característiques tan diferents que tenen.

Realitzant investigacions sobre el tema, una de les qüestions més estudiades i de les que hi ha més informació al respecte del tractament de gasos a través d'un tractament biològic, en el nostre cas centrat en les biopel·lícules, és sobre la transferència de matèria. Aquest concepte, gràcies a models on s'ha intentat simular el comportament del sistema (Mudliar et al. 2008), s'ha pogut obtenir informació sobre els principals paràmetres que afecten a la transferència de matèria, en l'article esmentat anteriorment permet observar que el consum de substrat és un d'aquests paràmetres. Tanmateix, segons W, Horn, Hempel (2002) amb un estudi realitzat amb una biopel·lícula formada per microorganismes heteròtrofs, el qual es centrava també en la transferència de matèria, va determinar en aquest cas amb l'ús dels microelèctrodes que efectivament el substrat és un paràmetre que causa variacions importants dins de la biopel·lícula. Al igual que aquest últim, recerques de Zhang, Bishop (1994) han determinat que la densitat al igual que la porositat i la tortuositat són paràmetres que gràcies a l'ajuda dels microsensores (Revsbech & Jorgensen 1986) i dels models cinètics (Yurt et al. 2003) s'ha pogut estudiar com influeixen en el comportament de la biopel·lícula i són factors clau en la transferència de matèria.

Un exemple d'estudi centrat en la biopel·lícula, com pot ser el de Zhu, Suidan, Alonso, Yu, Kim, Kim (2001), en el que es volia simular el transport de matèria dins de biofiltres percoladors amb l'ajuda de microelèctrodes per caracteritzar els factors limitats de la biopel·lícula. Un altre exemple com aquest pot ser el de Zhang, Bishop (1994) en el

que amb la biopel·lícula formada per microorganismes heteròtrofs es va treballar amb la tècnica de micro-tall per poder estudiar en profunditat l'estructura d'aquesta, fent vàlides les investigacions de Melo (2005) on els dos autors coincidien en que la biopel·lícula era tortuosa i que la matriu és heterogènia i, per aquest motiu, es creen canals dins d'aquesta per on es difon l'oxigen i es transporta el substrat.

Pel que fa als microsenors, són una eina poderosa per fer mesures a petita escala. En els darrers anys s'han aplicat en qüestions mediambientals com pot ser el seguiment de canvis de concentracions i característiques de les biopel·lícules. Tenint en compte que l'oxigen és un paràmetre clau per a la caracterització de la biopel·lícula, microelèctrodes d'oxigen dissolt han pres una gran importància en aquests estudis (Lee, Lim, Seo, Bishop, Papautsky 2007; Revsberch, Jorgensen 1986). Els més utilitzats en les investigacions sobre la biopel·lícula són els microsenors Clark (Horn & Hempel 1997), encara que són fràgils, cars i poc repetitius.

Actualment el grup de recerca ha desenvolupat uns microsenors molt avançats que permeten amb la introducció de la tecnologia MEMS realitzar perfils al interior a la pel·lícula i per tant ens permet realitzar seguiments a través de la biopel·lícula (Lee, Seo, et al. 2007), però de forma més versàtil ja que proposa un ventall d'opcions per poder-ho fer més ampli.

El que s'està desenvolupant actualment dins del món d'aquests sensors és la fabricació de sensors DO-MEA (Guimerà et al. 2014; Lee, Seo, et al. 2007), on la funció del sensor és la determinació de la quantitat d'oxigen dissolt que hi ha en la biopel·lícula. Aquests sensors són capaços de realitzar mesures i de monitoritzar canvis de concentracions locals en petites estructures amb una alta resolució espacial i proporcionar molts avantatges respecte als altres microsenors que són necessàries per estudiar les biopel·lícules (Lee, Seo, et al. 2007). A l'Epsm, dins del grup d'investigació sobre el Tractament de gasos i olors (TRAGASOL) s'està realitzant una tesi doctoral centrada en el desenvolupament d'un microsensor per a la monitorització del oxigen dissolt i el pH per a la caracterització de biopel·lícules, amb l'objectiu d'augmentar el coneixement disponible de les tecnologies de tractament biològic de contaminants gasosos.

Destacar la importància dels microsenors per caracteritzar biopel·lícules i a partir de tot el que s'ha explicat en aquest apartat es defineixen els següents objectius per a aquest treball que tracta sobre desenvolupar una metodologia que permeti caracteritzar biopel·lícules a partir del seguiment dels perfils d'oxigen en el seu interior utilitzant microsenors. Un altre dels propòsits és establir uns protocols de monitoratge

de biopel·lícules que puguin ser reproduïts de manera inequívoca. Cal afegir que tot aquest treball es realitzarà sobre un suport que ens ajudarà a mantenir la biopel·lícula immobilitzada per simular de millor forma el comportament real d'un reactor. Per dur a terme aquesta caracterització les accions que haurem d'estudiar són:

- Observar com es difon l'oxigen a través del gruix de la biopel·lícula depenent de les condicions (endògenes o de degradació) del sistema al fer variacions respecte el temps.
- Modelitzar l'activitat metabòlica de la biopel·lícula a partir d'un model, ajustant les dades experimentals.
- Determinar la dinàmica de la biopel·lícula a partir de realitzar un seguiment amb els microsensores Clark i MEMS, en condicions variants que simulin les condicions més habitual sota les que treballaran les biopel·lícules (per exemple càrrega intermitent de substrat o oxigenació).
- Efecte que causa la variació de la velocitat de circulació en diferents condicions al nostre sistema en quant a la difusió de l'oxigen, com a procés limitant de la tecnologia.
- Modelitzar el nostre sistema per obtenir paràmetres de la biocinètica del nostre sistema.
- Establir quines avantatges i desavantatges tenen la utilització dels microsensores Clark i MEMS per a l'estudi de biopel·lícules.

3. Introducció

3.1 Contaminació atmosfèrica

La contaminació atmosfèrica es defineix com la presència d'una substància aliena durant un cert temps i com la presència de contaminants en concentracions anormals. Aquesta es pot produir per emissió (escapament de substàncies sòlides, líquides o gasoses de qualsevol tipus i procedència que afecten l'aire exterior) i també per immissió (quan els contaminants emesos per diferents focus es distribueixen en l'atmosfera). Conèixer el nivell d'immissió és conèixer el nivell de qualitat de l'aire que respirem.

Tal i com es descriu en (Envitech n.d.) cada cop més la població és més conscient de que la contaminació és un greu problema, a pesar d'això en les últimes dècades ni la Unió Europea (UE) ni Espanya han fet res al respecte en quant a la limitació d'immissions de males olors. Fundamentalment això es degut a que l'olor és una sensació subjectiva i per la seva medicació és necessària una tècnica empírica, l'Olfatometria, que no havia estat desenvolupada i acreditada fins la darrera dècada, l'any 2005 va ser recollida en la norma UNE-EN 13725 en "Qualitat del aire - Determinació de la concentració de l'olor per Olfatometria dinàmica". Aquesta norma hauria de servir com a base per promoure normatives de qualitat ambiental, com ha succeït a Catalunya amb l'Avantprojecte de llei contra la Contaminació Odorífera.

Les principals fonts d'emissió dels contaminants atmosfèrics són centrals tèrmiques, processos industrials, trànsit automobilístic i calefaccions, on els principals contaminants i les seves conseqüències segons (Certificación n.d.) són:

- **Òxids de sofre (SO_x):** els més destacats en quant a contaminació atmosfèrica són el diòxid de sofre SO_2 i el triòxid de sofre, SO_3 .
El diòxid de sofre en concentracions elevades pot provocar irritacions als ulls i problemes respiratoris.
El triòxid de sofre no sol estar durant molt temps en l'atmosfera ja que amb contacte amb l'aigua provoca que aquest reaccioni i es transformi en àcid sulfúric, H_2SO_4 , causant l'efecte de la pluja àcida.
- **Sulfur d'hidrogen (H_2S):** en altes concentracions és un gas tòxic que provoca olors desagradables. Es produeix de forma natural per putrefacció de la matèria orgànica, en el fons dels llacs i bassets que es troben en condicions

anaeròbiques, en absència d'oxigen. En quant a l'origen antropogènic és clàssic d'indústries papereres i també de les refineries.

- **Òxids de nitrogen (NO_x):** és un grup important dels gasos contaminants. Els més destacats en quant a efectes contaminants és el diòxid de nitrogen, NO_2 i el òxid nítric NO . Aquests òxids són generats per causa d'altres temperatures en els processos de combustió, ja que les altes temperatures permeten la combinació del nitrogen amb l'oxigen. També es causat per els automòbils. Els efectes contaminants d'aquests gasos són la reducció de la visibilitat, la corrosió d'alguns materials i la disminució del creixement d'algunes plantes agrícoles.
- **Òxids de carboni (CO_x):** els principals contaminants d'aquesta família són el monòxid de carboni, CO i el diòxid de carboni, CO_2 .

El monòxid de carboni es produeix per la combustió incompleta de combustibles orgànics, per falta d'oxigen. Els màxims productors són els automòbils i processos industrials on intervé la combustió. Aquest monòxid de carboni es una substància altament tòxica ja que combinada amb l'hemoglobina de la sang evita el transport de l'oxigen i provoca problemes respiratoris.

En canvi el diòxid de carboni és un gas que es torba en l'atmosfera comunament en l'atmosfera en concentracions de 0.03%. Es produeix de forma natural en la respiració dels éssers vius i en la combustió, i també es important per l'efecte hivernacle que provoca al absorbir les radiacions solars.

- **Metà CH_4 (hidrocarburs):** el metà és el contaminat que representa la major part de contaminació de la família dels hidrocarburs. Provocat especialment per els automòbils processos de combustió de la matèria orgànica i refineries de petroli. Els hidrocarburs poden reaccionar amb els òxids de nitrogen i provocar el fenomen de la boira fotoquímica baix les radiacions solars.
- **Compostos halogenats:** els que afecten a la contaminació de l'aire són els compostos formats per fluor, F , Clor, Cl , i els freons, compostos formats per clor i fluor. Els compostos de fluor són emesos especialment per les indústries de ceràmica, alumini i de vidre. Un augment de la concentració de fluor en els organismes pot tenir conseqüències negatives, i reaccionant amb el vapor d'aigua es genera àcid fluorhídric, un gas molt corrosiu.
Els compostos de clor són emesos per l'industria petroquímica, per els processos de combustió de materials plàstics i altres que continguin clor. Aquest clor és un gas que provoca una olor sufocant i a la vegada tòxic.

Els freons són gasos que s'utilitzen com a propulsors d'aerosols i en sistemes de refrigeració. Aquests gasos provocaven problemes en la capa d'ozó i per això actualment s'ha limitat el seu ús.

- **Metalls:** els metalls amb més índex d'emissió a l'atmosfera són: el plom, el cadmi, el níquel, el ferro, el mercuri, el crom, el coure, el magnesi i l'arsènic. El més important i el que més abunda és el plom. Prové de la gasolina que s'utilitza per els automòbils.

Tots aquests metalls tenen característiques tòxiques i s'acumulen en els teixits dels organismes.

- **Compostos orgànics volàtils (COV'S):** Són tots aquells hidrocarburs que es presenten en estat gasos a temperatura ambient. Aquests compostos solen estar formats per un nombre de carbons inferiors a dotze i contenir elements com oxigen, fluor o clor entre altres, d'on es destaquen com a més importants el metà, el toluè, el età, l'etilè, el propà, el n-pentà i el benzè. Aquests compostos es poden classificar en, compostos que són extremadament perillosos per la salut, compostos que poden causar danys significatius al medi ambient o amb menor impacte.

Aquests poden provenir de la utilització de dissolvents orgànics al treballar en indústries com la cosmètica, la farmacèutica o bé de pintura.

Aquests també perjudiquen al desgast de la capa d'ozó i provoquen que baixi fins a nivells terrestres i provoqui danys respiratoris, a més a més aquest compostos es bioacumulen en les cèl·lules dels organismes vius produint efectes negatius en la salut.

3.2 Tractament dels contaminants gasosos i olors

En el tractament de gasos contaminants, l'objectiu principal és reduir la càrrega d'un o més d'aquests contaminants. El fet de que hi hagin molts tipus de tractaments de gasos i de que a la vegada hi hagin una gran quantitat de processos que generen corrents de diferents contaminants, fa que cap tecnologia sigui la millor ja que les possibilitats de tractament són molt grans.

A l'hora d'escollir tècnica tenim dos grans blocs, les tècniques fisicoquímiques i les biològiques.

Les tècniques fisicoquímiques, són tècniques on es realitzen reaccions químiques o transferència de matèria per eliminar el contaminant del corrent gasós. En els processos de transferència de matèria es separa el contaminant de la fase gasosa

transferint-lo a una altra fase, líquida o sòlida, on després s'haurà de tractar. Uns exemples d'aquestes tècniques poden ser l'absorció, on el contaminant gas queda retingut en un líquid, i l'adsorció, on el contaminant gas queda retingut en un sòlid. En canvi en els processos per reacció química el que es pretén és transformar el contaminant en una espècie de menys contaminant. Generalment són processos on es realitza una oxidació de compostos orgànics. Les tècniques més utilitzades són la incineració i l'oxidació catalítica. Aquestes tècniques fisicoquímiques solen ser cares, perilloses i a més a més no eliminen del tot el contaminant.

Per a l'altre banda, les tècniques biològiques utilitzen la varietat metabòlica dels microorganismes per degradar, transformar o acumular una ampla gamma de compostos. Perquè el biosistema funcioni correctament en la eliminació dels contaminants, aquests han de ser biodegradables, solubles i a la vagada no ser nocius per al sistema biològic. Actualment aquestes tècniques presenten un elevat grau d'eficàcia ja que s'han estudiat de forma intensiva, solucionant les limitacions que inicialment presentaven, sent així una alternativa als sistemes convencionals que es venien utilitzant els darrers anys.

3.3 Tècniques per al tractament biològic de gasos

Hi ha diferents tipus de bioreactors amb diferents configuracions per als diversos efluents contaminants gasosos que existeixen. Els més utilitzats són els biofiltres convencionals i els biofiltres percoladors, per a la seva eficàcia i per el seu baix cost d'operació. També hi ha altres sistemes de tractament com els bioentadors.

3.3.1 Biofiltres convencionals

Els sistemes de tractament biològic com el del biofiltre convencional el que busquen és la capacitat metabòlica que tenen els microorganismes per biodegradar compostos gasosos. Per això l'aire es fa passar per un llit purós on està contendia la biomassa activada, com es pot veure en Figura 1. Per afavorir l'absorció el que es fa es distribuir uniformement l'aigua per tota la superfície per efecte de la gravetat, on la quantitat d'aigua ve determinada per les dimensions del nostre biofiltre.

Per tal que la transferència dels contaminants es realitzi de forma efectiva, és necessari que el gas estigui en contacte amb el llit durant un cert temps, durant el temps en el que el llit està en contacte amb el contaminant, la biopel·lícula que forma el llit, el degrada.

La biomassa que forma el llit del biofiltre pot ser de qualsevol tipus de material orgànic amb unes característiques de composició i estructurals adequades, tant físiques com químiques per eliminar de forma adequada el contaminant i a la vegada mantenir un gran nombre de microorganismes formant aquesta biopel·lícula tant important.

Hi ha dos tipus de configuracions en quant a biofiltres convencionals. Els oberts on només operen amb un corrent de gas ascendent i els tancats que poden operar cap a qualsevol direcció però amb limitacions en volums que no tenen els oberts.

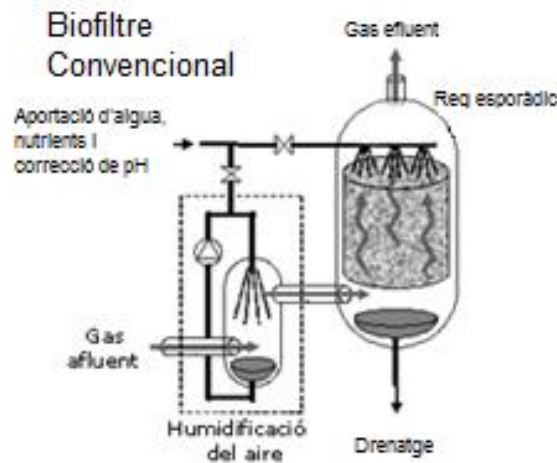


Figura 1. Diagrama d'un biofiltre convencional. Figura adoptada de (Animalesweb S.L 2014).

3.3.2 Biofiltre percolador de tractament de gasos

El sistema percolador aporta un major control en comparació als biofiltres convencionals. En aquest cas hi ha unes transferències físico-químiques i biològiques on el que es vol aconseguir és que el corrent gas amb el contaminant es transfereixi al líquid, el qual seguidament es traspassa a la biopel·lícula que es forma en el llit del biofiltre. El funcionament en aquest cas és exactament el mateix que l'anterior, on el que es pretén és eliminar el contaminant amb biomassa (biopel·lícula).

En la Figura 2 es pot veure un esquema senzill d'un biofiltre percolador on també hi ha una recirculació del medi de cultiu. Aquest sistema com hem dit anteriorment presenta una sèrie d'avantatges que fan que sigui un millor sistema que l'anterior, (García 2012), com per exemple que es poden eliminar productes intermedis creats en alguna reacció gràcies al sistema de recirculació i tenir una major facilitat per el control de les variables com el pH o la composició de medi.

L'inconvenient principal del és que no es pot treballar amb contaminants amb solubilitat baixa ja que la etapa limitant del procés és l'absorció del gas en el líquid.

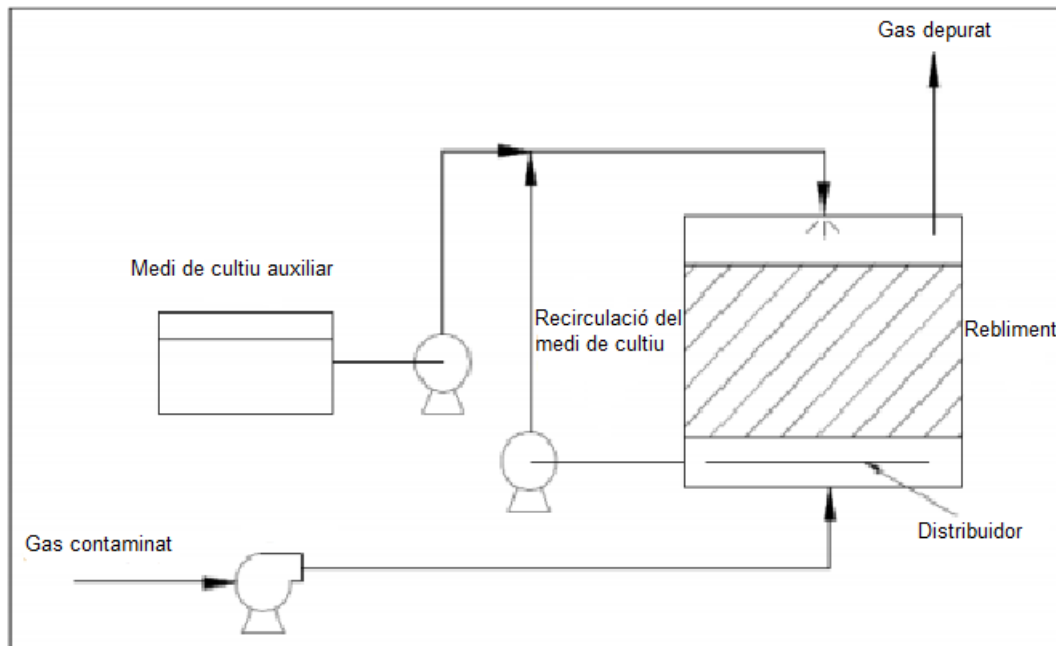


Figura 2. Diagrama d'un biofiltre percolador. Figura adoptada de (García 2012).

3.4 Biopel·lícula

3.4.1 Fonaments

Les biopel·lícules o biofilm es defineixen com a comunitats de microorganismes que creixen junts en una matriu de polímers extracel·lulars i adherits a una superfície inert o teixit viu, (Uzcudun 2005).

La composició d'aquest biofilm és molt variable en funció del sistema d'estudi, però en general el component majoritari en un 97% és aigua. A part d'aigua i de les cèl·lules bacterianes la matriu bacteriana està formada bàsicament per polímers extra cel·lulars. En menor quantitat trobem macromolècules com DNA, proteïnes i productes derivats de la lisis de les bactèries.

En diferents investigacions, una de les diferents qüestions que es plantejaven en l'estudi refent al biofilm és l'interior d'aquest, si els nutrients com el nitrogen o l'oxigen podien tenir accés a l'interior de la biopel·lícula. S'ha pogut demostrar que la matriu no és sòlida i que presenta canals per on flueixen aigua, nutrients i oxigen fins i tot en zones molt profundes d'aquest. Això no evita que dins d'aquest biofilm no ens trobem diferents ambients de concentracions de nutrients, pH i oxigen.

3.4.2 Creixement de la biopel·lícula

Depenent de les condicions ambientals les diferents bacteries poden créixer adherides a una superfície o bé en suspensió en el medi. Depenent de la seva forma de créixer, es podrà crear diferents tipus de perfils per poder quantificar el creixement. Hi ha dos mètodes per trobar perfils segons Yurt, Beyenal, Sears i Lewandowski (2003), que són trobar la concentració adequada de substrat i determinar un bon procediment de càlcul. Els autors esmentats anteriorment van decidir aplicar un procediment creat a partir de paràmetres biocinètics per descriure el creixement de la biopel·lícula en el que el control dels substrat era un paràmetre clau. En canvi l'estudi realitzat per (Gao & Han 2012), van utilitzar amb èxit el mètode símplex per reproduir els perfils de substrats, a pesar de que aquest mètode no era vàlid per aplicar-lo directament en els biofilms. Amb aquests dos exemples es pot veure com els dos mètodes són vàlids per determinar perfils. Independentment dels perfils que milloren les condicions de creixement de les biopel·lícules, aquest està format per 4 fases, que estan detallades a continuació:

Tal i com es mostra en Uzcudun (2005), l'etapa inicial en la formació del biofilm és l'adherència sobre la superfície, com es pot observar en la primera fase de la Figura 3. Si posem l'exemple de les bacteries gram-negatives com per exemple *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* s'ha pogut observar que els flagels, les fimbres de tipus I, IV y els curli (pel de la bactèria que li permet l'adherència), són importants per l'etapa d'adherència primària. Un altre aspecte que ajuda és la mortalitat, ja que contraresta les repulsions hidrofòbiques. Tanmateix la mortalitat no és un requisit essencial, moltes bacteries com les gram-positives immòbils com estafilococs, estreptococs y micobacteris, són capaces de formar biofilm (utilització de proteïnes). Un cop realitzada l'adherència en la superfície comencen a dividir-se i a formar colònies que vindria a ser molt semblant al procés en plaques d'agar.

Cal esmentar que (Melo 2005) està d'acord amb (Uzcudun 2005), ja que posteriorment la colònia de bacteries ja adherides a la superfície, comença a secretar un polímer extracel·lular que constitueix la matriu de la biopel·lícula, on aquesta matriu és heterogènia amb raïms fets de cèl·lules i polímers distribuïts al atzar al llarg d'una arquitectura tridimensional envoltades per canals d'aigua que van des de la part superior fins a la inferior. La composició del polímer extracel·lular és diferent en cada bactèria, fins i tot, estudis realitzats recentment confirmen que la mateixa bactèria

depenent de les condicions ambientals es capaç de produir diferents polímers extracel·lulars com a components de la matriu de la biopel·lícula.

Finalment, en algunes bactèries s'allibera una part de la matriu per poder colonitzar altres zones i heterogeneïtzar el medi colonitzant noves superfícies, tancant els procés de formació de la biopel·lícula, aquesta heterogeneïtat comentada ha estat contrastada per Zhu, Suidan, Alonso, Yu, Kim, Kim (2001) i Melo (2005), entre altres. Aquesta colonització de noves superfícies es fa gràcies a un procés on la síntesis del polímer extracel·lular varia i gràcies a aquesta variació es possible arribar a altres zones tal i com indica l'estudi de Uzcudun (2005).

El procés d'inserció de l'element passa de forma molt poc comú dins de la comunitat bacteriana (freqüència de 10^{-6}) on la clau del procés és produir bactèries deficientes en la síntesis del polímer extra cel·lular i per tant deficient en la formació de la biopel·lícula. Això permet tenir un petit percentatge de la població incapaç de sintetitzar el polisacàrid i escapar del biopel·lícula per colonitzar altres zones, ja que la inserció és un procés reversible, quan arribin a una altre superfície tornaran a sintetitzar el polímer extra cel·lular i a formar una nova matriu, Figura 3.

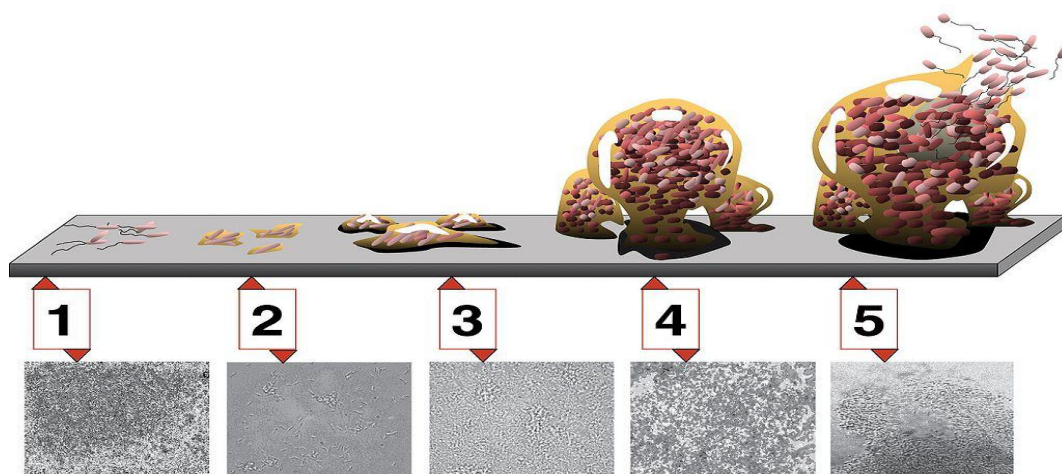


Figura 3. En els punts 1 i 2 es reflecteixen les fases d'adherència a la superfície, en els punts 3 i 4 es pot veure la formació de la matriu heterogènia i en la 5, fase final, el desprendiment de les colònies, (Davis 2007).

Segons Uzcudun (2005), el procés de formació del biofilm està regulat entre d'altres el "quorum sensing" o autoinducció. El sistema del quorum sensing és un mecanisme de regulació dependent de la acumulació en el medi de la molècula senyal, autoinductor, que fa sentir a la bactèria la quantitat de població existent. En les bactèries gram-negatives el autoindicador són els pèptids. Quan s'acumula en el medi una quantitat indicada del autoindicador activa un receptor específic que altera l'expressió de gens afectant a diferents fenotips.

3.4.3 Caracterització de les biopel·lícules

Com ja s'ha explicat anteriorment, les biopel·lícules són sistemes multifàsics formats per sòlids en una fase líquida que es troba en l'espai buit entre els sòlids. On la majoria d'aquetes biopel·lícules estan caracteritzades per la seva heterogeneïtat pel conjunt de tipus de cèl·lules que les formen i gradients de paràmetres físics i químics, com es detalla en (Zhang & Bishop 1994). Com a resultat d'aquests gradients espacials s'han pogut estudiar les espècies microbianes i la densitat i dins d'aquesta, com està distribuït el biofilm per determinar la seva fracció de volum (porositat) i la tortuositat.

Un dels paràmetres més rellevants i a la vegada més estudiats en l'entorn que afecta a les biopel·lícules és la densitat. En treballs anteriors (Lawrence et al. 1991), a través de làsers es va poder observar l'estructura de la biopel·lícula. I en treballs com el de S. Masuda (1991) es va poder comprovar que tallant en 3 capes la densitat augmenta amb la profunditat. En l'estudi realitzat per (Zhang & Bishop 1994), que es basava en realitzar talls en rodanxes per estudiar amb microelèctrodes l'estructura de la biopel·lícula i la distribució espacial de les propietats d'aquesta. En aquest estudi es va determinar que la tècnica del micro-tall es fiable i, a més a més, aquesta tècnica ofereix una visió més real de les poblacions originals de les biopel·lícules i a la vegada no es perd mostra. En aquest estudi al igual que el (Masuda 1991), es va arribar a la conclusió de que a mesura que augmenta la profunditat augmenta la densitat.

Com s'ha comentat anteriorment un dels principals aspectes que afecten als gradients espacials de la biopel·lícula són els porus que es formen en el seu interior, a l'igual que (Smith, Coackley 1984), (Zhang & Bishop 1994) mitjançant la tècnica del micro-tall, va intentar descriure les distribucions espacials de densitats, porositats, l'estructura que tenien i la seva àrea específica. Es va demostrar que a l'augmentar la profunditat els sòlids totals són majors i en canvi la porositat disminueix, a més a més, el radi mitjà també segueix la mateixa tendència que els porus i és més gran en les capes superiors que en les inferiors. Mitjançant tècniques com microslicing i la microscòpia làser en (Zhang & Bishop 1994), s'ha pogut determinar que com ja s'ha explicat anteriorment que la densitat canvia amb la profunditat, però a la vegada també ha proporcionat informació sobre que la biopel·lícula és tortuosa, està hidratada, conté porus i canals per on pot circular el substrat. La tortuositat afecta a les característiques de la biopel·lícula perquè és un paràmetre clau que pot fer que dos biopel·lícules amb la mateixa densitat variïn molt en la seva difusió, (Melo 2005). La tortuositat és la via de connexió més llarga imposada per obstacles dins d'un sòlid porós en relació al

moviment. Aquest fenomen va estrictament relacionat amb la densitat i la difusió ja que depenent de les característiques del sistema aquest factor farà que disminueixin o augmentin. Tanmateix un sistema més dens no té perquè ser més tortuós, la relació que existeix entre tortuositat i densitat depèn d'altres aspectes. Un experiment realitzat per (Melo 2005), es va determinar que en un sistema turbulent, un augment de la densitat feia augmentar la tortuositat i disminuir la difusió i en canvi (Casey et al. 2000), gràcies a les seves investigacions va experimentar que en un sistema amb un flux laminar, la tortuositat augmentava o disminuïa en funció a la densitat seca de la biopel·lícula.

Per l'estructura tan complexa i a la vegada petita, per poder estudiar-los s'han d'utilitzar microelèctrodes i tècniques de microscòpia, on es pot observar l'estructura interna de la biopel·lícula i els seus buits. Les biopel·lícules solen créixer en medi aquàtic on aquestes formen part del nostre ambient i actualment dels sistemes tecnològics. Algunes poden arribar a ser nocives però si aprenem a utilitzar-les correctament es podrien obtenir grans beneficis en la seva utilització com per exemple en el tractament d'aigües residuals. S'han fet molts avanços en aquest aspecte i s'ha demostrat que gràcies a la seva estructura hidrodinàmica un fluid pot circular a través de la biopel·lícula, (Eberl et al. 2000). Per tant una de les grans aplicacions que té el biofilm és el tractament d'aigües residuals o gasos contaminants. El que nosaltres volem en el nostre treball és analitzar els sistemes biològics pels tractaments de gasos, i una bona tècnica per a la eliminació de gasos és la biofiltració de la qual ja s'ha parlat en apartats anteriors, 3.3, on gràcies a l'estructura del biofilm permet un bon pas de flux dels contaminants

3.4.4 Tipus de biopel·lícula

La biopel·lícula està composta per microorganismes com s'ha esmentat en apartats anteriors, i aquests poden ser de diferents tipus. En aquest treball en destacarem dos, heteròtrofs i autòtrofs, encara que només treballarem amb els primers.

Els organismes heteròtrofs són aquells que necessiten substàncies del medi per alimentar-se i obtenir energia. Aquests microorganismes no poden fabricar el seu propi aliment i necessiten obtenir energia a través de matèria orgànica processada per altres organismes, mitjançant reaccions de catabolisme. En canvi, els microorganismes autòtrofs, a diferència dels heteròtrofs esmentats en l'apartat anterior si que són capaços de sintetitzar els seus propis aliments a través de substàncies inorgàniques per el seu metabolisme. La massa cel·lular i la matèria orgànica es processada a través del CO₂, que és inorgànic i utilitzant la llum com a font d'energia.

3.5 Procés d'eliminació dels contaminants en la biopel·lícula

3.5.1 Transferència de matèria

Tal i com s'explica en (Masciarelli et al. 2012), els fenòmens de transport o processos de transferència són aquells que estableixen un moviment de massa o energia degut a una força. La transferència de massa és molt comú en la naturalesa i en la rama d'enginyeria ja que té moltes aplicacions com poden ser la renovació de materials contaminants de les corrents gasoses o la difusió de neutrons en un reactor nuclear.

El mecanisme de transferència de matèria depèn de la dinàmica del sistema, hi han dos mètodes de transferència de massa:

1. Convecció: La massa es transfereix pel moviment del fluid ja sigui en règim turbulent o laminar.
2. Molecular o difusió ordinària: És la transferència de molècules individuals a través d'un fluid pel moviment realitzat per a les molècules degut a una diferència de concentracions. Aquesta difusió es pot donar en sistemes estancats o en moviment.

La difusió en els gasos és una propietat física que depèn dels components, pressió i temperatura, a causa de les característiques que tenen els gasos s'han tingut que desenvolupar formules per poder fer aproximacions.

En canvi, segons (Masciarelli et al. 2012) la difusió molecular en sòlids està més detallada i aquesta es divideix en dos grans camps la difusió de gasos o líquids en porus d'un sòlid i en la interdifusió de pel moviment intermolecular.

- La difusió de gasos o líquids en porus d'un sòlid: Aquesta difusió es pot portar a terme mitjançant tres mecanismes, la llei de Frick (porus grans, gas dens), difusió de Knudsen (porus petits, molècules més grans que el porus), difusió superficial (molècules transportades al llarg de la superfície).
- Difusió efectiva: Com que els porus no tenen formes definides i tenen trajectòries tortuoses amb interconnexions, no és fàcil descriure la difusió individual dins de cada porus, per tant el que es fa es definir un coeficient global que descriu el promig de difusió que passa en qualsevol posició dins de la biopel·lícula.

En el treball realitzat per Mudliar, Banerjee, Vaidya, Devotta (2008) es va estudiar l'avaluació de la difusió externa i interna amb una biopel·lícula immòbil i constant, per tal d'intentar predir la transferència de massa que hi havia. L'estudi es va realitzar amb el bioreactor immobilitzat ja que és una millor alternativa que no pas treballar amb la

matèria en suspensió, els beneficis que aporta el sistema immobilitzat són que la operació sigui més senzilla, les pèrdues de cèl·lules siguin menors, hi hagi estabilitat física i química i que es necessiti menys energia. En aquest estudi es va tenir present la difusió del substrat a través de la pel·lícula, on el substrat és un factor a tenir en compte perquè aquest varia a causa de la difusió i el seu consum. Seguint amb (Mudliar et al. 2008), es va detallar que la eficiència global de la biopel·lícula té en compte el substrat i el seu consum i s'indica que hi ha una tendència de creixement amb l'augment de la concentració de substrat fins arribar a un valor límit des del qual disminueix. Tanmateix, es va arribar a la conclusió de que si augmenta la velocitat l'eficiència global també.

Pel que fa a la transferència de substrat en la superfície de la biopel·lícula, tal i com s'indica en l'estudi anteriorment comentat hi ha dificultats de transferència per culpa de la resistència que ofereix aquesta zona no deixant passar el fluid, al igual que en la investigació de (Res et al. 1985) on un augment de la transferència de massa depèn estrictament de la rugositat en la superfície i de la difusió d'eddy (difusió degut al moviment de Foucault, mescla causada per remolins que provoquen la dispersió de les partícules i faciliten la seva difusió). La velocitat de transferència de massa depèn de la rugositat esmentada anteriorment, una conclusió a la que es va arribar experimentant amb un model tridimensional de convecció de difusió i reacció en un sistema porós per analitzar la influència de la hidrodinàmica i la heterogeneïtat en les estructures dels processos de transferència de matèria per (Eberl et al. 2000).

Tal i com es mostra en (W et al. 2002), es va treballar amb biopel·lícules heteròtrofes en reactors tubulars i la investigació amb la utilització de microelèctrodes es va centrar en la transferència de matèria. Tenint en compte que hi ha poca informació de la dependència de la densitat en la transferència de matèria, (Bryers & Characklis 1981) va donar el primer informe sobre densitat, substrat i condicions hidromètriques. En la experimentació realitzada en el treball en qüestió es va observar que la densitat augmenta amb l'augment de la tensió de cisallament, amb l'augment de càrrega de substrat i amb l'augment del flux.

La hipòtesis del treball era estudiar la dependència de la transferència de matèria i de la densitat de la biopel·lícula a partir de la càrrega de substrat i de les condicions hidromètriques, on es va demostrar que si que influenciaven a la densitat del biofilm. Arribant a les conclusions següents, la densitat augmenta quan la capa límit disminueix, és a dir, es torna més prima, fet que fa augmentar el flux de substrat que va relacionat amb el Reynolds. El despreniment del biofilm provoca una renovació

d'aquest fent que variïn les condicions on la densitat i la càrrega de substrat augmenten. Un augment de la càrrega de substrat afecta a les condicions hidromètriques fent variar el gruix de la capa límit. La transferència de massa està influenciada per a la càrrega del substrat en la interfase.

Per tant gràcies a estudis com (W et al. 2002), podem determinar que la densitat es un aspecte a tenir en compte quan parlem de transferència de matèria.

Per finalitzar, ens centrarem en l'estudi realitzat per (Horn & Hempel 1997) en el qual es va avaluar mitjançant microelèctrodes Clark els coeficients de matèria en la interfase de la biopel·lícula en un sistema d'autòtrofs. Dos paràmetres que fan variar el transport del biofilm són la mort i la respiració endògena, degut a aquests factors hi ha canvis de volums dins de la biopel·lícula.

Es va determinar que en la superfície el creixement era òptim ja que es disposava de oxigen i substrat suficient, pel contrari a una certa profunditat al no arribar substrat aquests moren, creant així material inert. La mort es també un paràmetre es que es té en compte en la cinètica de Monod.

Al igual que els autors comentats en aquest apartat de transferència de matèria i Horn, Hempel (1997), han determinat que el coeficient de difusió disminueix al augmentar la profunditat i que en la majoria dels casos la densitat augmenta amb la profunditat.

3.5.2 Transferència entre fases de la biopel·lícula

Fent referència a (Alcón et al. 2005) la transferència de matèria entre las fases del sistema és un dels fenòmens a tenir en compte. El mecanisme global de transport de nutrients a les cèl·lules, la utilització d'aquests i la producció de metabòlits són etapes que formen part del cicle dels microorganismes i que ofereixen una resistència en la transferència de la matèria.

En els bioreactors, normalment, la resistència en la fase líquida és la part més important en el procés de la transferència la qual està composta per les etapes de resistència pel·lícula líquid i la interfase gas-líquid. Aquesta etapa és on bàsicament es realitza la transferència de l'oxigen en el líquid provocant unes resistències degudes a la baixa solubilitat d'aquest en l'aigua. Resistència de la fase líquida, en la separació del medi aquos. Resistència de la fase líquida en la proximitat de la interfase sòlid-líquid, és una resistència molt significativa com es pot observar en la Figura 4 ja que hi ha poca diferència entre el medi aquos i la fase sòlida (biopel·lícula). Resistència de la fase sòlida en la que la capa formada per a la biopel·lícula dificulta la transferència de

la matèria a través d'aquesta, però gràcies a la seva heterogeneïtat es pot difondre en petites porcions.

Anteriorment, s'han descrit les diferents fases que es poden donar en la biopel·lícula, i estudis realitzats per a la determinació dels límits de les capes com (W et al. 2002) mitjançant microelèctrodes, on aproximadament es van utilitzar 200 perfils al llarg de la investigació, confirmen aquestes fases en la biopel·lícula. En la Figura 4 es mostra el mètode utilitzat que serà el mateix que s'utilitzarà en aquest treball per avaluar els perfils dels microelèctrodes. L'experimentació consisteix en determinar diferents zones dins de la biopel·lícula, la regió lineal del perfil de concentració amb pendent dc/dz se suposa que és dins de la biopel·lícula. La part considerablement vertical a la superfície del biofilm pertany a la fase de massa completament barrejada i finalment el gruix de la capa límit de la concentració L_c es defineix com la distància del perfil entre las parts lineals.

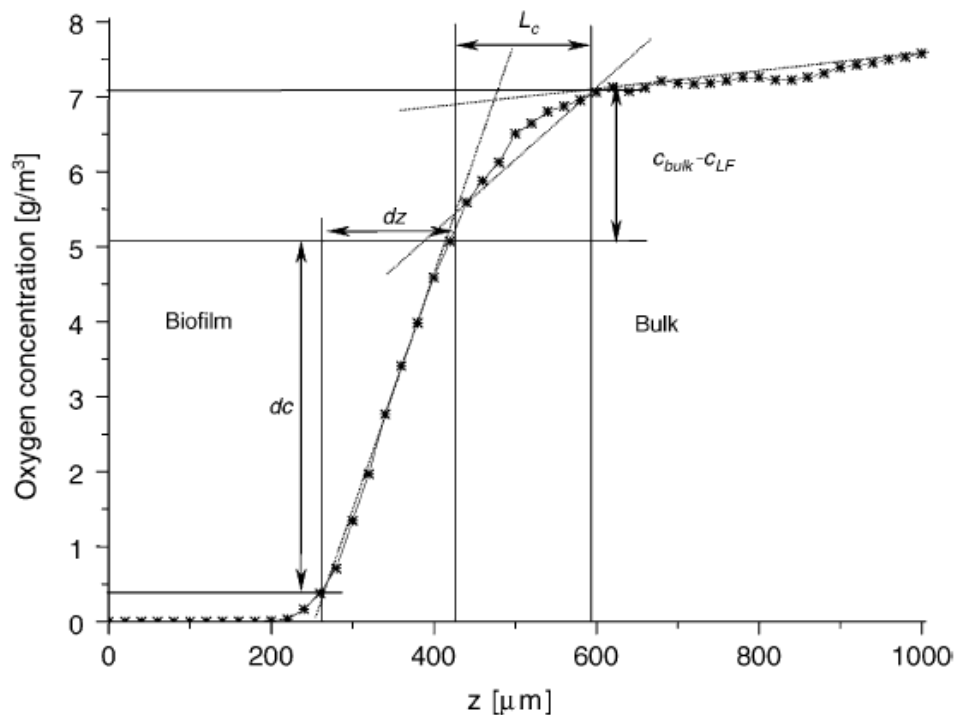


Figura 4. Determinació del espessor de la capa límit de la biopel·lícula mitjançant perfils d'oxigen (W et al. 2002). La zona marcada per dc , ens determina l'altura en g/m³ de la biopel·lícula, la dz , la longitud de la biopel·lícula en μm, en canvi la $C_{bulk} - C_{LF}$, ens marca l'altura que té la interfase en g/m³ i la L_c la longitud d'aquesta en μm. D'aquesta manera es pot determinar les diferents fases de l'estudi d'un perfil.

3.5.3 Biocinètica

Al parlar de cinètica ens referim a la velocitat de biodegradació del substrat dins de la biopel·lícula al reaccionar químicament. La definició de cinètica al treballar amb microorganismes segons (Alcón et al. 2005) és: *la correlació que existeix entre velocitats i concentracions de reactius/productes, els quals són introduïts en els balanços de matèria i permeten la predicció del grau de conversió de substrats i el rendiment de productes individuals en altres condicions d'operació.*

Tenint en compte aquesta definició podem entendre que la velocitat de degradació es pot expressar mitjançant equacions. A continuació es mostraran els principals models empírics que intenten reflectir el creixement biològic en funció del substrat.

El model cinètic de Monod, (Monod 1949), és el que realitza una simulació més exacte del comportament de la biopel·lícula fins al moment i a la vegada el més utilitzat. En aquest model es relaciona la taxa de creixement amb la concentració de substrat, on aquest no afecta quan no es limitant. A continuació trobem l'expressió del model de Monod:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S_i}{K_{sMi} + S_i} \quad \text{Equació 1}$$

On μ és la velocitat específica de creixement bacterià (s^{-1}), μ_{\max} (s^{-1}) és la velocitat màxima de creixement, el paràmetre S_i és la concentració de substrat, K_s és la constata de velocitat mitja (mgOD/L), que ens determina l'afinitat dels microorganismes amb la eliminació de substrat. A menor K_s major afinitat i més ràpida serà l'eliminació.

Per una altra banda Tessier, (Ghose et al. 1976), utilitza un concepte diferent al relacionar la diferència de concentracions amb una expressió logarítmica relacionant la velocitat de creixement amb la concentració de substrat com es mostra en l'equació 2.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(1 - e^{-\frac{S_i}{K_{sTi}}}\right) \quad \text{Equació 2}$$

Entre les dos expressions anteriors, que són les més estudiades i a la vegada més utilitzades, la cinètica de Monod és millor que la de Tessier ja que dona resultats més reals, aquesta afirmació és contrastada en l'article (Yurt et al. 2003).

La cinètica de Monod s'utilitza contínuament per descriure la taxa de captació de substrat pel biofilm i la taxa de creixement específic en els rangs de baixa

concentració (Zhou et al. 2009). La OUR, és la tasa de consum d'oxigen, la velocitat a la que es consumeix l'oxigen en una base volumètrica (Santos et al. 2006).

La tasa de consum d'oxigen (q_o) segueix una corba tipus Monod de saturació cinètica que es pot observar en la Figura 5. A partir de la qual es poden obtenir els paràmetres cinètics que descriuen el comportament de la biopel·lícula.

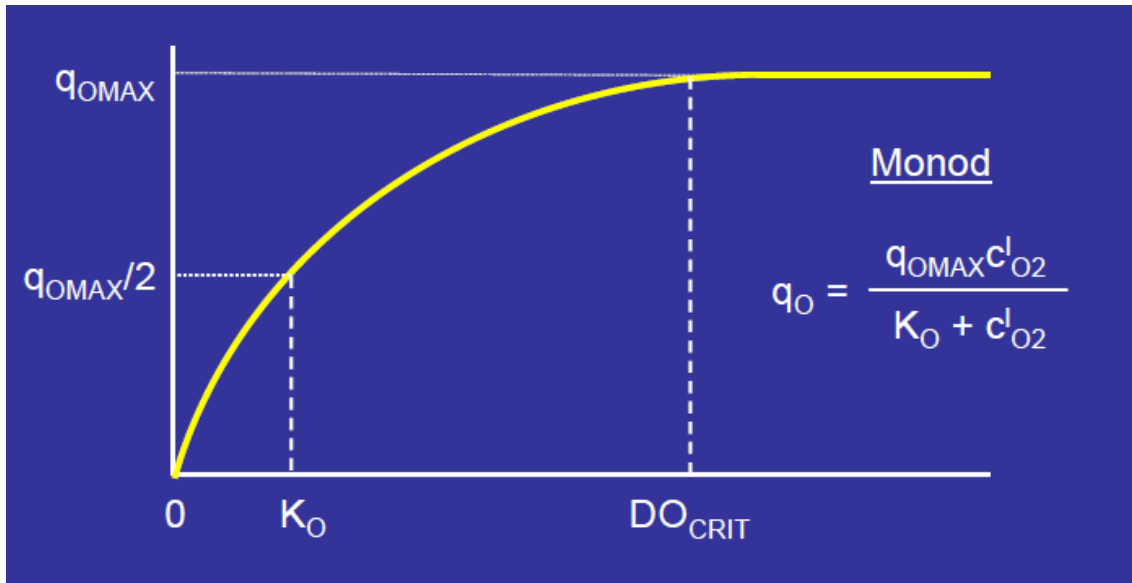


Figura 5. Corba de consum a partir de la cinètica descrita per Monod.

3.6 Selecció del sistema d'estudi per a la caracterització de les biopel·lícules

El sistema experimental serà molt important per al desenvolupament del projecte ja que tots els processos dependran d'aquest per tant s'ha de fer una bona selecció de biomassa, medi mineral i de reactor experimental.

La selecció de biomassa a estudiar es triarà depenent de l'experiment que es vagi a realitzar per poder aplicar els resultats a casos reals.

En la selecció del medi amb el que es vagi a treballar ha de complir que totes les substàncies que el formin vagin destinades al creixement de la biomassa i que també a de ser capaç de seleccionar el tipus de microorganisme que volem que es reproduïxi, tenint en compte que s'aprofita l'activitat metabòlica d'aquests microorganismes, el medi mineral haurà de contenir com a nutrient els diferents compostos que es vulguin obtenir.

Per estudiar el desenvolupament de les biopel·lícules en escala laboratori el que més s'utilitza són els reactors de biopel·lícules on es reproduïxen els fenòmens dels reactors naturals. Aquests han de poder permetre que els estudis que es vulguin realitzar no tinguin limitacions i que es pugui caracteritzar els processos que es desitgin.

3.7 Microsensores

La modelització dels processos de biodegradació és una eina molt útil a tenir en compte per a la optimització de les biotecnologies relacionades amb el tractament de gasos, on les biopel·lícules tenen un paper predominant.

Es pot monitoritzar l'activitat que hi ha a l'interior de la biopel·lícula on l'oxigen és el paràmetre més importat ja que fa de receptor d'electrons, i ens pot ajudar a determinar si les zones són aeròbiques o anaeròbiques. Al realitzar mesures dins del biofilm, el que podem aconseguir és obtenir més coneixements sobre els processos de transport de matèria i la biodegradació. Per a la caracterització de les biopel·lícules necessitem eines, aquestes eines són els microsensores, els més importants són els d'oxigen i els de pH, d'oxigen que són potser els més rellevants hi ha dos tipus, Clark i microsensores basats en tecnologia MEMS.

Dins dels microsensores Clark distingim dos tipus, els amperomètrics, on la determinació de la concentració ve donada per a la reducció que té lloc en l'electròlit on s'aplica una diferència de potencial entre l'elèctrode de referència i l'elèctrode de treball per una fort tensió externa, com per exemple el microsensor Clark d'oxigen i de sulfur. Per l'altre banda tenim els potenciòmetres que són aquells on la senyal primària és un potencial elèctric derivat del fruit de la interacció entre l'analit i l'element de reconeixement. La mesura es realitza a intensitat nul·la amb un elèctrode de referència com es el cas del microsensor Clark de pH.

Tots aquests microsensores estan explicats en detall en els següents punts.

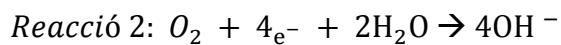
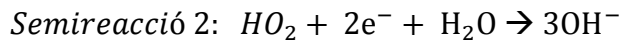
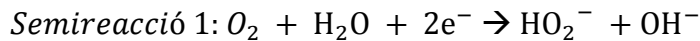
3.7.1 Microsensores electroquímics o de tipus Clark d'oxigen

El microsensor Clark són les sondes electroquímiques més utilitzades per a la detecció del l'oxigen en el biofilm (Moya et al. 2014). Aquest microsensor està format per un sistema de tres elèctrodes electroquímics amb un elèctrode de referència, un auxiliar, un comptador i un últim elèctrode que treballa en solució aquosa, com es pot veure en la Figura 6. Al igual que en el darrer article, (Lee, Lim, et al. 2007) i (Revsbech &

Jorgensen 1986) coincideixen en que el sistema d'electrons conté una membrana selectiva en la que l'oxigen es difon a una velocitat proporcional a la pressió parcial. On es forma un corrent on es du a terme la reducció del oxigen generada en el càtode on el potencial ens marcarà la quantitat de oxigen en la solució.

Es produeixen dos reaccions en el càtode, on una d'aquestes està composta per dos semireaccions que són les següents:

Reacció 1:



Segons (Revsbech & Jorgensen 1986), el gran problema que tenien els microsensores Clark era la fabricació de la membrana ja que aquesta ha de deixar passar l'oxigen a la vegada que es produeix un corrent, aquests problemes van ser solucionats per (Revsbech et al. 1983). A part d'aquest problema, els microsensores també tenen importants limitacions com la gran fragilitat i el seu elevat cost, a part de que realitzar una adquisició de perfils és una acció realment complicada, tediosa i inexacta. En la Figura 6 es pot observar la punta del microsensor amb un augment considerable, veient la complexitat d'aquests i la seva extrema fragilitat.

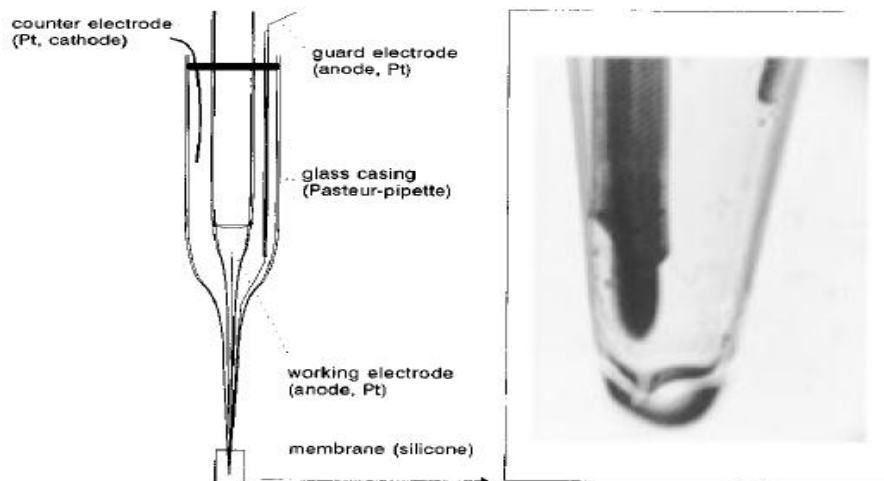


Figura 6. Sensor Clark on es fa un augment en la punta. (Jeroschewski et al. 1996).

3.7.1.1 Fabricació dels microsensores electroquímics o de tipus Clark

El procés de fabricació dels microsensores de tipus Clark es duen a terme de forma gairebé artesanal ja que la seva fabricació depèn de tècniques molt complexes i de diferents etapes.

La primera etapa consisteix en la construcció de la carcassa la qual s'elabora amb l'ajuda d'una pipeta Pasteur, seguint les indicacions descrites en (Revsbech & Jorgensen 1986), aquesta pipeta és estirada manualment al ser escalfada a través d'escalfadors fins arribar aconseguir el diàmetre desitjat. La membrana de goma es aplicada en la punta a partir d'una silicona capil·lar. En la segona etapa el que es fa és integrar un fil de platí de 10 μm de diàmetre en el capil·lar de vidre fent que quedi exposada a una àrea de platí de uns 10 a 20 μm , de tal forma que haurem construït el càtode. La tercera etapa del procés de fabricació consisteix en instal·lar i realitzar les connexions elèctriques del càtode i de l'ànode. Finalment, en la quarta etapa el que és fa es omplir el sensor d'electròlit i segellar el sensor i ja estarà llest per realitzar les seves funcions. En la Figura 7, es pot visualitzar el microsensor amb totes les seves parts diferenciades.

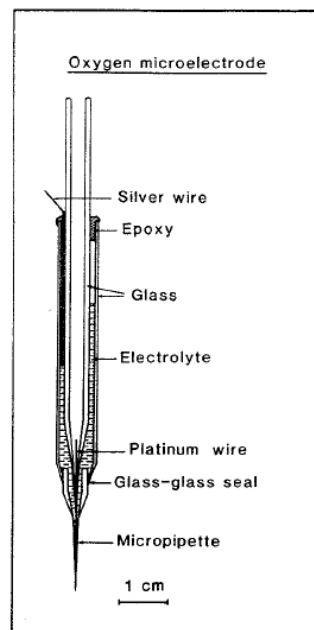


Figura 7. Sensor Clark on es poden diferenciar les principals parts que el componen. Figura extreta de (Revsbech & Jorgensen 1986).

Cal comentar que, tal i com es conclou, al veure la fabricació dels microsensores tipus Clark, la fabricació dels sensors mai serà exactament la mateixa ja que el procés de fabricació és manual i això dona lloc a que hi hagin diferències en les àrees canviants dels elèctrodes, en les distàncies entre els elèctrodes. Tot això deriva a que cada micosensor tindrà una resposta diferents a l'hora de realitzar la mesura.

3.7.2 Microsensores Clark de pH

Quant a microelèctrodes de pH com el de la Figura 8, es poden trobar de molts tipus de variants en aquest microelèctrodes, segons (Revsbech & Jorgensen 1986), el diàmetre pot variar o bé amb el material que estan fabricats, per exemple els microelèctrodes de pH que tenen una membrana sensitiva detecten en menor proporció els H_2 i a més a més tenen un període de vida més curt que els fabricats amb cristall, però en canvi aquests poden tenir un diàmetre més petit ($1\mu m$).

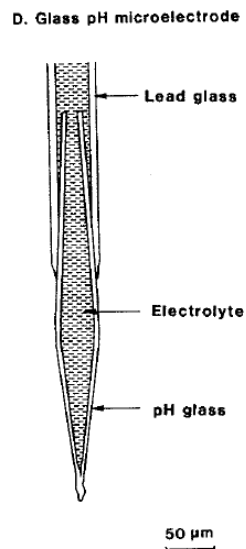


Figura 8. Microelèctrode de pH, adoptada de (Revsbech & Jorgensen 1986).

3.7.2.1 Fabricació del microelèctrode de pH

El microelèctrode de pH es construeix amb cristall sensitiu al pH i que a la vegada es conductiu. El cristall de pH es escalfat per a una flama on a la vegada se li aplica un calor elèctric creant bucles metàl·lics com es pot observar en la Figura 9, i es creen bucles metàl·lics. El capil·lar hauria de ser de 10 g de llarg i la punta d'aquest acabar en forma cònica a $5-10\mu m$. El capil·lar agafa forma gràcies a la gravetat, on el cristall conductiu tindrà uns $20-50\mu m$ d'amplada. Posteriorment, es trenca el capil·lar per el costat més gruixut, es neteja i se li afegeix silicona en els cristalls.

El cristall conductiu es posicionat amb la punta amunt i s'introdueix el cristall de pH, es fusionen els dos cristalls amb calor i finalment la punta queda tancada. Es realitzen processos de temperatura i de hidratació per finalitzar el procés de fabricació.

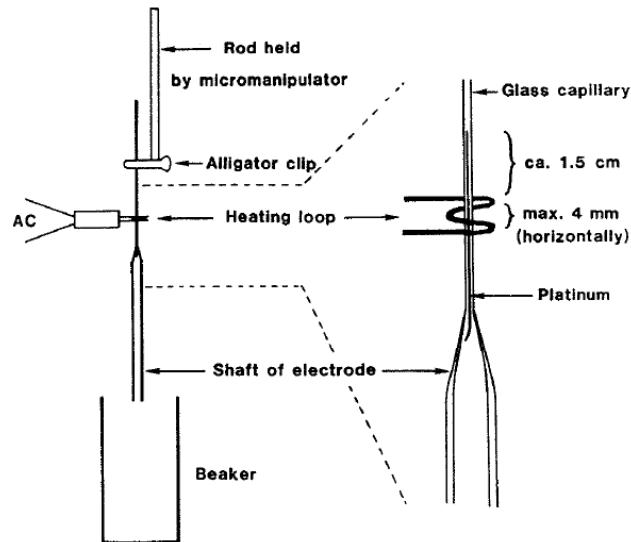


Figura 9. Construcció del microelèctrode de pH, on s'observa el tractament que se li dona al cristall, figura obtinguda de (Revsbech & Jorgensen 1986).

3.7.3 Microsensores Clark de sulfur

El microelèctrode de sulfur que es pot veure en la Figura 10, depèn molt estrictament de la concentració dels ions de S^{2-} , del pH i del sulfur dissolt. El pH és un paràmetre molt important a l'hora de realitzar la mesura amb aquest microsensor i si sabem el pH exacte del medi es podrà realitzar una presa de dades correcta.

El calibratge del micorsensor és molt important com es reflexa en (Revsbech & Jorgensen 1986) perquè com s'ha comentat abans el pH és important i encara no s'ha pogut acorar la mesura amb el microsensor i per aquest motiu el calibratge es tant estricte.

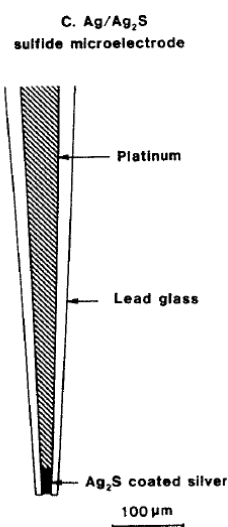


Figura 10. Microelèctrode de sulfur, adoptada de (Revsbech & Jorgensen 1986).

3.7.3.1 Fabricació del microelèctrode de sulfur

El microelèctrode de sulfur Ag/Ag₂S es construït a partir de processos similars als descrits anteriorment per fabricar el càtode de O₂ (Revsbech & Jorgensen 1986). Però en aquest cas la sonda-linia es substituïda per aïllants de vidre de plom i la capa de platí es aplicada per electroplating i el elèctrode es submergit en una solució de 0,1 M de sulfat de amoni per el recobriment posterior de Ag/Ag₂S.

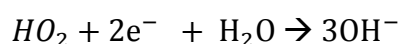
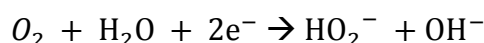
3.7.4 Microsensores tipus MEMS

Els microsensores de tecnologia MEMS com a tals, funcionen i estan basats amb un sistema microelectromecànic (MEMS) que s'ha desenvolupat per millorar el rendiment del microsensor i el monitoratge de les biopel·lícules (Guimerà et al. 2014). La tecnologia MEMS facilita un disseny més versàtil i permet la fabricació de microelèctrodes de diferents mides, geometries, entre altres. A més a més, al contrari que els Clark aquests tipus de sensors es poden fabricar en massa fent que aquesta sigui més rentable i aconseguint una uniformitat (Lee, Seo, et al. 2007). D'aquests microsensores se'n poden destacar grans aplicacions com l'obtenció d'informació qualitativa de la estructura de la biopel·lícula i de la seva activitat, sent aplicable a la biomedicina i en temes ambientals.

A partir d'aquesta tecnologia el que s'ha aconseguit es desenvolupar sensors capaços de captar la difusió del oxigen a partir d'una matriu de microelèctrodes (DO-MEA). Segons les investigacions de (Guimerà et al. 2014), el microsensor està compost per una sèrie de microelèctrodes d'or alineats, que facilita la mesura de 1mm en les perfils de oxigen dissolt.

El funcionament d'aquest microsensor DO-MEA, descrit en l'article anterior, es basa en els principis de modelatge amparomètrics. Les mesures de l'oxigen es porten a terme amb un sistema electroquímic amb un potenciòmetre i una cel·la de tres elèctrodes convencionals. L'oxigen arriba a través de la mostra fins al càtode d'or, Figura 11, on en aquest hi té lloc la reacció electroquímica en la qual es provoca el potencial derivat de la reacció.

La reacció que es produeix és la següent:



3.7.4.1 Fabricació dels sensor DO-MEA amb tecnologia MEMS

Tal i com expliquen els següents autors (Lee, Seo, et al. 2007), (Guimerà et al. 2014) i la fabricació d'aquests microsensors consisteix de forma resumida en diferents etapes:

La fabricació dels microsensors en qüestió s'ha de realitzar en sales blanques amb un sever control. A través de tècniques de fotometria estàndard, s'han de dipositar tres capes metàl·liques per polvorització catòdica sobre una oblea de Pyrex. La primera capa metàl·lica és de titani (15nm) per millorar l'adhesió. La segona capa metàl·lica és de níquel (15nm) per prevenir la formació de compostos intermetàl·lics i fer de barrera de difusió. La tercera i última capa és d'or (150nm). Seguidament els elèctrodes i les pistes metàl·liques s'igualen amb banys de grabat humit selectiu. Finalment, es defineix l'àrea que tindrà l'elèctrode per la seva activació i les zones de connexió. Cada agulla s'estableix la connexió amb el circuit imprès i la unió a través del fil metàl·lic s'estableix per les connexions elèctriques.

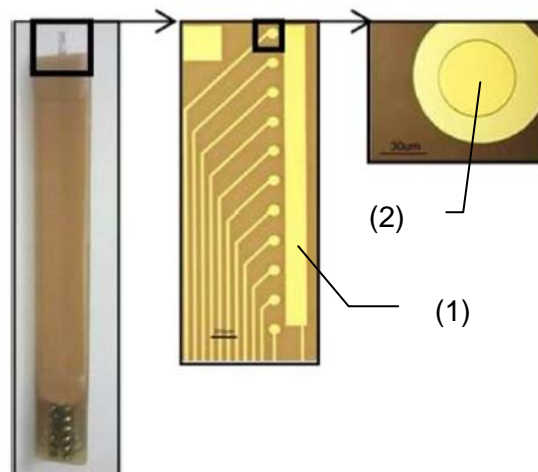


Figura 11. Microelèctrode amb la tecnologia MEMS adoptada per formar un DO-MEA, (Guimerà et al. 2014), on es pot veure les parts d'or on es centra la figura en les quals té lloc la reacció de reducció de l'oxigen. (1) contraelèctrode de referència intern, (2) elèctrode del microsensor separats per 50 µm.

Com s'ha pogut observar en la descripció del procés de fabricació d'aquests microsensors, no es tan escrupolós com en el cas dels sensors Clark. Aquests tenen una estructura més robusta i es poden fabricar en cadena, al contrari que l'altre, això fa també abaratir el preu del consegüent.

4. Materials i mètodes

En aquest apartat del treball es detallarà de forma clara i entenedora com s'han realitzat els processos i quins han estat els materials utilitzats en la experimentació per a la caracterització de les biopel·lícules, de forma que es pugui utilitzar com eina d'estudi.

4.1 Microsensores

La utilització dels microsensores es el que ens permet realitzar el monitoratge dins de les biopel·lícules, per tant és una part fonamental del nostre sistema. En el nostre treball utilitzarem els microsensores Clark i els MEMS.

4.1.1 Microsensor OD

En el procés de creixement i de monitoratge de les biopel·lícules es va utilitzar el microsensor Clark d'oxigen dissolt OXI-25, Unisense, Dinamarca. L'objectiu per el qual es vol utilitzar aquest tipus de sensor és per obtenir valors d'oxigen dissolt, en la biopel·lícula, de gran resolució degut a la gran sensibilitat que tenen.

4.1.2 Microsensor de pH

A l'igual que el microsensor de OD, el de pH l'utilitzarem per determinar el pH del nostre biosistema, el microsensor utilitzat també es tipus Clark, PH - 25, Unisense, Dinamarca. El sensor de pH necessita un microsensor de referència per obtenir valors.

4.1.3 Microsensor de referència

El microsensor de referència Clark, Ref – 100, Unisense, serveix, com s'ha esmentat anteriorment, per obtenir els valors de pH dins del biosistema. El microsensor de referència serveix per calcular el potencial que es crea entre el microsensor de pH amb el de referència, que han d'estar en el medi on es fa la mesura per al mesurament.

4.1.4 Microsensor MEMS

Aquest microsensor també és utilitzat per mesurar l'oxigen dissolt en la biopel·lícula però amb la gran avantatge que ens facilita les seves característiques de deixar-lo en un punt concret de la biopel·lícula durant un període de temps i obtenir diferents valors a la vegada de profunditats diferents.

4.1.5 Sensor DUMMY

El sensor DUMMY és un sensor de prova d'agulla rígida, Figura 12. L'utilitzarem per mesurar el guix de la biopel·lícula. No necessita calibratge ni altres tractaments ja que la seva funció es basa en introduir el sensor en la fase líquida i mesurar la distància fins al fons del reactor, per posteriorment calcular el seu gruix.



Figura 12. Sensor DUMMY

4.2 Preparació dels microsensores

Pel monitoratge les biopel·lícules amb els microsensor prèviament s'han de realitzar una sèrie d'operacions d'activació perquè el funcionament dels aparells sigui el més òptim possible.

4.2.1 Activació dels microsensores tipus Clark

L'activació dels microsensores tipus Clark per a la mesura del oxigen dissolt, es realitza perquè les molècules d'oxigen dissoltes en l'electròlit que envolta el càtode provoquen que la mesura realitzada per el microsensor no correspongui a la concentració real del medi, sinó, que les molècules que ja estaven dissoltes en el càtode reaccionen junt amb les del medi de mesura fent que les mesures no siguin correctes, per tant cal fer l'activació dels microsensores amperomètrics.

L'activació consisteix en augmentar la diferència de potencial que hi ha entre el càtode i l'ànode a 0,9 V (pic de corrent), fent d'aquesta manera que la reacció de l'oxigen al

cànode s'acceleri i s'elimini l'excés de molècules dissoltes en l'electròlit del cànode, on posteriorment es torna als 0,8 V al que treballa el microsensor.

4.2.2 Activació i protecció dels microsenors MEMS

La preparació dels microsenors MEMS és molt important perquè els elèctrodes es troben desprotegits, i s'embruten fàcilment. Les operacions d'activació, tenen com a objectiu eliminar la brutícia i les impureses de la superfície dels elèctrodes i deixar disponible per a la detecció de l'oxigen la major àrea possible, ja que quan més gran sigui l'àrea dels elèctrodes, major serà la sensibilitat del sensor. Per la preparació d'aquest microsenors, s'han de realitzar una sèrie d'accions per assegurar-nos el seu correcte funcionament.

Neteja:

El primer pas es realitzar la neteja, que és un mètode electroquímic utilitzat per crear bombolles a la superfície del elèctrode per eliminar les possibles impureses. En el nostre cas per dur a terme aquesta neteja utilitzarem una solució de KOH (0.1M) juntament amb aigua oxigenada (H_2O_2), en proporcions volumètriques de (3:1). La barreja d'aquests dos compostos provoca l'alliberació de bombolles d'oxigen que realitzaran la funció de neteja.

El següent pas és comprovar si la neteja ha eliminat les impureses de la superfície dels elèctrodes. La comprovació la realitzarem fent una Voltametria cíclica.

Voltametria cíclica (CV):

Aquest mètode s'utilitza com a eina per a la determinació de mecanisme de processos electroquímics. La voltametria es caracteritza principalment per a l'aplicació d'una pertorbació potencial en forma de variació lineal amb el temps. El fonament teòric de la voltametria relaciona el corrent de pic i el potencial de pic amb altres paràmetres experimentals, concentració, àrea dels elèctrodes i temperatura.

Per a realitzar la voltametria cíclica el que farem serà estudiar l'evolució de les substàncies de Fe^{2+}/Fe^{3+} (0.01M) i a l'hora una de KNO_3 (0.1M) per evitar l'electromigració. Seguidament tenim els càlculs realitzats per les solucions anteriors:

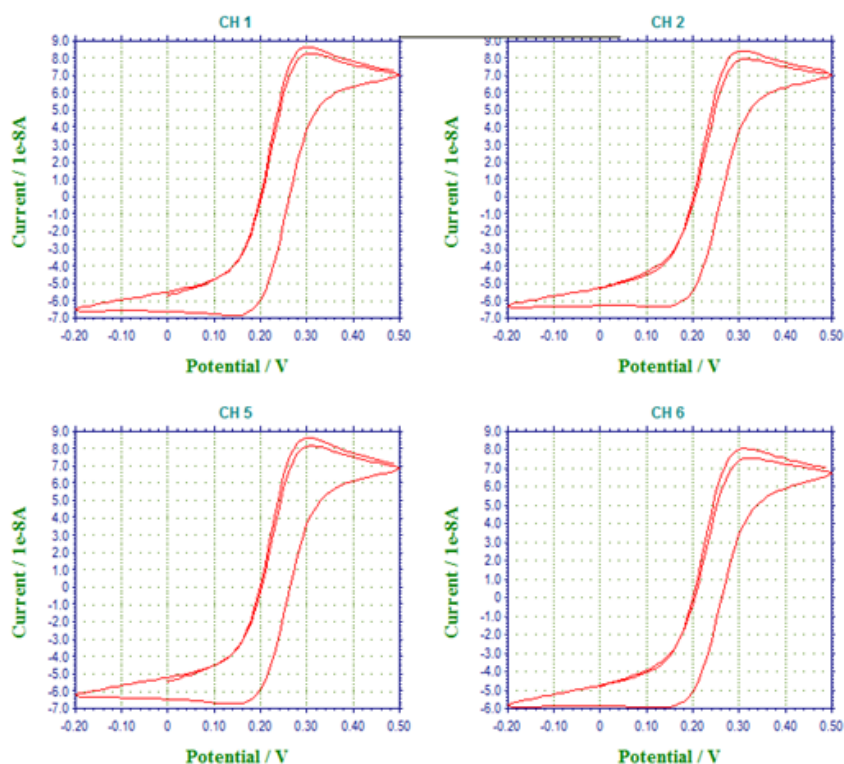
Càlculs de les solucions anteriors:

$$0.1 \text{ l} \cdot \frac{0.01 \text{ ml } Fe(CN)_6^{3-}}{1 \text{ l}} \cdot \frac{329.26 \text{ g } K_3Fe(CN)_6}{1 \text{ mol } Fe(CN)_6^{3-}} = 0.32926 \text{ g } K_3Fe(CN)_6$$

$$0.1 \text{ l} \cdot \frac{0.01 \text{ ml } \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}}{1 \text{ l}} \cdot \frac{422.41 \text{ g } \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6}{1 \text{ mol } \text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}} = 0.42241 \text{ g } \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$$

$$0.1 \text{ l} \cdot \frac{0.1 \text{ mol } \text{KNO}_3}{1 \text{ l}} \cdot \frac{101.1 \text{ g } \text{KNO}_3}{1 \text{ mol } \text{KNO}_3} = 1.011 \text{ g } \text{KNO}_3$$

Una vegada preparades les solucions ja podem passar a realitzar la voltametria cíclica. S'omple el recipient on es farà la valoració amb les solucions preparades anteriorment, i s'equiparà amb el microsensor MEMS i es connectarà al potenciòmetre. Es fixen els límits potencials a través del programa CHI1010C Electrochemical Analyzer, en el qual s'haurà de seleccionar la tècnica de voltametria cíclica i adequar el paràmetres per realitzar-la. Un cop realitzada la configuració, el resultat esperat de la prova és el següent:



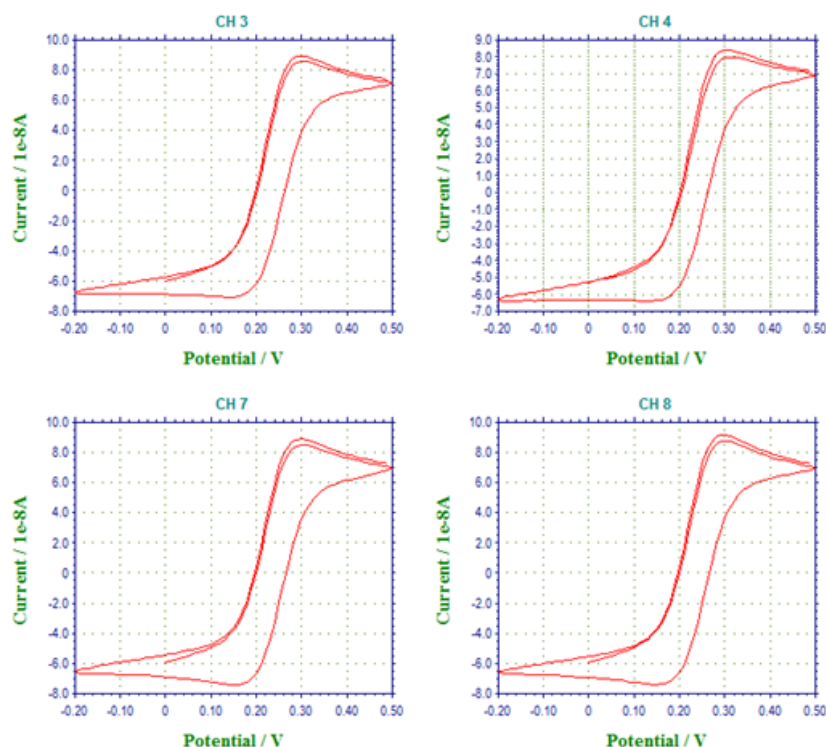


Figura 13. Voltametria cíclica on es veuen els dos pics provocats per la reacció d'oxidació i reducció de ferro, per tant el microsensor està preparat pel calibratge.

La voltametria cíclica depèn principalment de la concentració de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ i de l'àrea del elèctrode. Per tant, si es realitza sempre utilitzant la mateixa concentració de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, el resultat de la CV dependrà exclusivament de l'àrea dels elèctrodes. La CV d'un sensor activat correctament hauria de donar com a resultat la mateixa corba per a tots els elèctrodes on, a més a més, s'hi haurien de visualitzar els pics de reducció i oxidació del parell $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. A la Figura 13 es presenta una voltametria d'un sensor activat correctament perquè es visualitzen els dos pics perfectament, fet que demostra el la relació $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ha tornat com al principi i que el sensor està preparat per realitzar mesures.

En canvi si la voltametria no ha sortit bé s'ha de realitzar una nova neteja, seguint el mètode descrit anteriorment, i posteriorment, un cop realitzada la segona neteja, es torna a fer una voltametria per veure si els pics es diferencien amb facilitat i es pot començar a mesurar.

Una vegada el sensor està correctament activat, és procedeix a protegir els elèctrodes recobrint-los amb una membrana catòdica de Nafion. La membrana de Nafion protegeix els càtodes i l'ànode d'or, evitant que s'oxidin i que s'hi dipositin impureses.

El Nafion és un polímer dissolt en alcohols que crea una membrana en la punta del microsensor, per tal d'aplicar-lo només s'ha de introduir en el Nafion durant uns 10 segons i posteriorment extreure'l deixant que s'assequi durant 24 h per la correcta impregnació. Un cop passades les 24 hores cal realitzar una hidratació de una hora per poder tenir el sensor en ple rendiment.

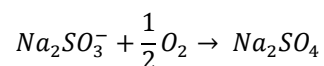
4.2.3 Calibratge dels microsensores

Establir amb exactitud la correspondència entre les indicacions de mesura del instrument i els valors de la magnitud que es mesuren amb ell és molt important per tal de ser precisos amb els resultats que s'obtinguin amb el microsensor.

4.2.3.1 Calibratge del microsensor d'oxigen

Una vegada realitzada l'activació del microsensor, el calibratge serà a dos punts, un on el medi estigui saturat d'oxigen i l'altre on en el medi sigui en condicions anòxiques. El punt de saturació d'oxigen s'obté bombollejant aire (21% de O₂). Un cop el medi està saturat d'O₂ amb una sonda d'oxigen portàtil, (OXICAL 325, WTW, Alemanya), agafarem el valor obtingut com a referència. Introduïm el valor en el programa Sensor trace basic 3.0.

A continuació agafem el microsensor d'oxigen i l'endinsem en el medi saturat d'oxigen, com es pot veure en la Figura 14, el deixem en contacte amb el medi fins que la senyal que obtenim és constant, llavors agafem aquest valor com el punt màxim de la recta de calibratge amb el programa anterior. Seguidament, el que s'ha de fer és introduir el microsensor en una solució anòxica, com per exemple una solució de sulfit de sodi, on hi té lloc la reacció següent:



A continuació, dictem en el programa que el valor que mesura el microsensor es de 0 i quan la senyal d'aquest sigui estable aplicarem aquest valor a la recta de calibratge. Amb els dos punts obtinguts, un de la saturació d'oxigen i l'altre de la falta d'oxigen podrem aplicar la recta de calibratge en el programa i començar a mesurar dins de les biopel·lícules.

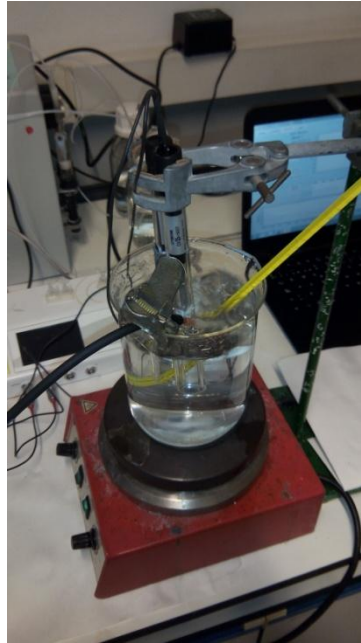


Figura 14. Calibratge del microsensor Clark, on s'està realitzant el bombejament d'oxigen

4.2.3.2 Calibratge del microsensor de pH

El calibratge en el microsensor de pH és més complex. El sistema està format per un microsensor de pH i un altre de referència que estan connectats al multímetre. El calibratge del sensor de pH és de 3 punts. El procés consisteix en introduir els dos microsensors en les diferents solucions tampons de 4.01, 7 i 9.21 fins que la senyal rebuda en el programa Sensor trace basic 3.0 sigui estable. Un cop estabilitzada s'afegeixen aquests punts per realitzar la recta de calibratge.

Una vegada s'hagi agafat un punt per la recta de calibratge amb els micorsensors s'ha de realitzar una neteja d'aquest per no fer variar el pH de les altres solucions i que el calibratge sigui correcte. Un cop ja hem obtingut els tres punts amb els tres pH diferents apliquem la recta de calibratge i ja podem passar a mesurar en la biopel·lícula. Aquest procediment normalment dura una hora.

4.2.3.3 Calibratge del microsensor MEMS

Per realitzar el calibratge d'aquest microsensor o bé per agafar perfils s'ha de tenir cura amb la punta que està impregnada per Nafion, membrana que ha d'estar sempre en contacte amb l'aigua ja que en el cas de que s'assequi pot esquarterar-se

El calibratge es realitza amb el mateix medi amb el que es treballarà. Es posiciona el microsensor MEMS de forma que estigui en contacte amb el medi. Posteriorment, es posen l'elèctrode de referència, que defineix el potencial que s'aplica i el contra elèctrode de platí, que tanca el circuit. Encara que la configuració descrita anteriorment

formada per dos elèctrodes externs és més estable, el microsensor MEMS també té integrat un contra elèctrode, en la mateixa punta, que es pot utilitzar sense modificar la resposta del sensor. Per tant, en funció de l'aplicació on es vulgui mesurar, utilitzarem amb l'ànode extern o intern, indistintament. Seguidament, s'introdueix la sonda d'oxigen que ens servirà per determinar l'oxigen en cada instant de temps, per posteriorment realitzar la recta de calibrat. Tot aquest sistema estarà a sobre d'un agitador magnètic, en la Figura 15 es pot veure tot el sistema de calibratge.

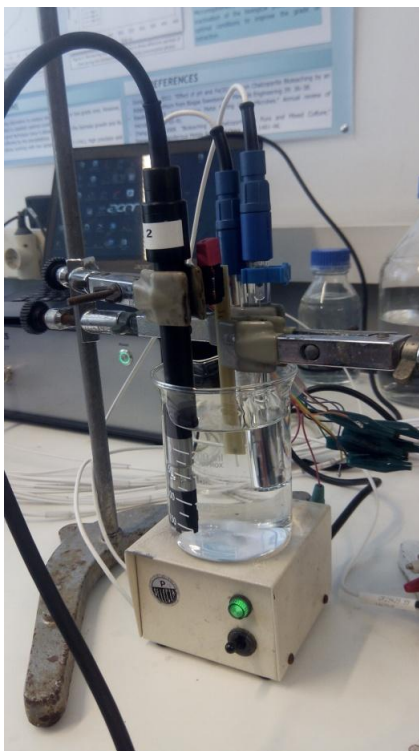


Figura 15. Sistema de calibratge del microsensor MEMS on es pot veure els materials que s'utilitzen.

Un cop s'han introduït la sonda d'oxigen, els dos ànodes i el càtode, es connecten al potenciòmetre que serà l'encarregat de transferir les dades obtingudes al programa CHI1010C Electrochemical Analyzer.



Figura 16. Potenciòmetre que s'utilitza per treballar amb els MEMS.

El primer pas és determinar el potencial que cal aplicar entre els càtodes i l'ànode per reduir l'oxigen i quantificar-lo amperomètricament. Mitjançant un linear sweep és determina el potencial en el qual es donen les reaccions descrites en l'apartat de la memòria, 3.7.4. El que s'ha de visualitzar en la prova que es realitza abans de fer el calibratge és el voltatge que marca quan es compleix la segona reacció de les anteriors. En cas de que s'utilitzi la referència interna i l'externa del mateix microsensor, es tindrà que realitzar el mateix procés per a les dos i per tant determinar dos voltatges, que si no hi ha problemes experimentals serà el mateix.



Figura 17. Visualització de l'evolució de les dos reaccions per determinar el voltatge necessari perquè es donin a terme.

Finalitzat aquest punt, el que fem és començar la recta de calibratge, per fer-ho, tindrem que anar fent mesures amb el mètode amperomètric del programa a diferents concentracions d'oxigen dissolt per obtenir una taula amb concentració d'oxigen en ppm de cada punt. Fem variar la concentració d'oxigen amb nitrogen, de forma que podem obtenir una taula com la següent, on en cada punt hem realitzat la tècnica amperomètrica on a través de la recta de calibratge i els valors del programa podrem saber quina és la concentració d'oxigen en cada instant del sistema.

Punt	Concentració d'oxigen (ppm)
1	7.82
2	6.74
3	5.75
4	4.78
5	3.84
6	2.86
7	1.94

Taula 1. Taula de calibratge dels sensors MEMS a diferents concentracions d'oxigen dissolt del dia 12-05-2015.

Mitjançant la correlació de les concentracions d'oxigen dissolt i les intensitats mesurades a aquestes concentracions (corrent provocat per a la reducció de l'oxigen), és possible obtenir la recta de calibrat del sensor. El resultat d'aplicar aquesta tècnica al final de tots el punts anteriors és el que es pot veure en la Figura 18, on es pot observar com quan la concentració d'oxigen disminueix, la intensitat mesurada per tots els elèctrodes també ho fa.

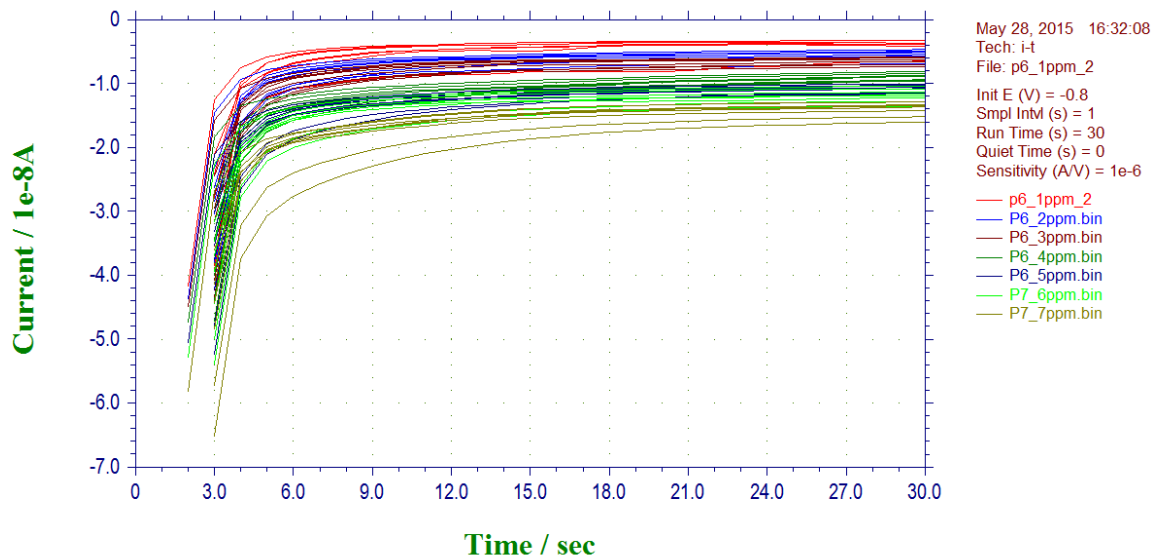


Figura 18. Resultat del calibrat amb la tècnica amperomètrica a diferents concentracions d'oxigen.

Aquest procés no compta com en el cas dels Clark amb un programa específic que et permet treballar des del mateix amb el sensor calibrat, i per això s'ha de realitzar aquesta pressa de dades a diferents concentracions d'oxigen per el seu tractament.

4.3 Sistema experimental per al cultiu

L'estudi de caracterització de les biopel·lícules es realitza utilitzant reactors de biopel·lícules de placa plana.

4.3.1 Descripció dels reactors

Els reactors de placa plana ens permet que el creixement de la biopel·lícula sigui immòbil, per aconseguir que la biomassa es quedi immobilitzada la superfície dels reactors ha de ser rugosa, impeding el moviment d'aquesta encara que flueixin gasos o líquids, per aquesta raó els dos reactors tenen la base amb aquesta superfície (Guimerà et al. 2013).

Les característiques del reactor ens facilitaran el creixement de les biopel·lícules sota condicions hidrodinàmiques establertes, la utilització dels microsensors per a l'estudi i la utilització de tècniques microscòpiques per caracteritzar la biopel·lícula. Els reactors estan construïts a partir de metacrilat per seguir el creixement de les biopel·lícules, ja que aquest és transparent, i que les peces que els formen van ser elaborades a partir d'una fresadora. A continuació, s'expliquen les característiques i les configuracions dels dos tipus de reactors.

4.3.1.1 Bioreactor placa plana fase líquida

El bioreactor de placa plana de fase líquida, Figura 20, es caracteritza principalment perquè l'alçada de la placa plana és baixa. Aquest disseny només permet treballar en fase líquida ja que no disposa de tapa. El reactor està format per un pou d'entrada amb dos connexions amb tubs perquè entri el fluid, i un pou de sortida amb dos connexions de tubs per l'evacuació del fluid. Els perfils d'oxigen mesurats sobre la biopel·lícula es van dividir en funció del punt del reactor on es mesuraven. La divisió es va realitzar en 4 seccions. El motiu d'aquesta divisió és intentar estudiar l'heterogeneïtat de la biopel·lícula, provocada sobretot per les condicions hidrodinàmiques del reactor.



Figura 19. Reactor amb la biopel·lícula i les 4 seccions on es realitzaran els perfils diferenciades.

La configuració del bioreactor en fase líquida està formada per un sistema de recirculació amb airejament perquè la biopel·lícula disposi de O_2 , dos bombes peristàtiques on una bombeja nutrients, substrat, medi mineral dependent de l'experiment a realitzar, i l'altre bombeja el líquid del sistema en recirculació, els microsensors Clark o MEMS i finalment el micromanipulador. Per veure la relació de cabals de les bombes anar a l'Apèndix 8: Calibratge de bombes.

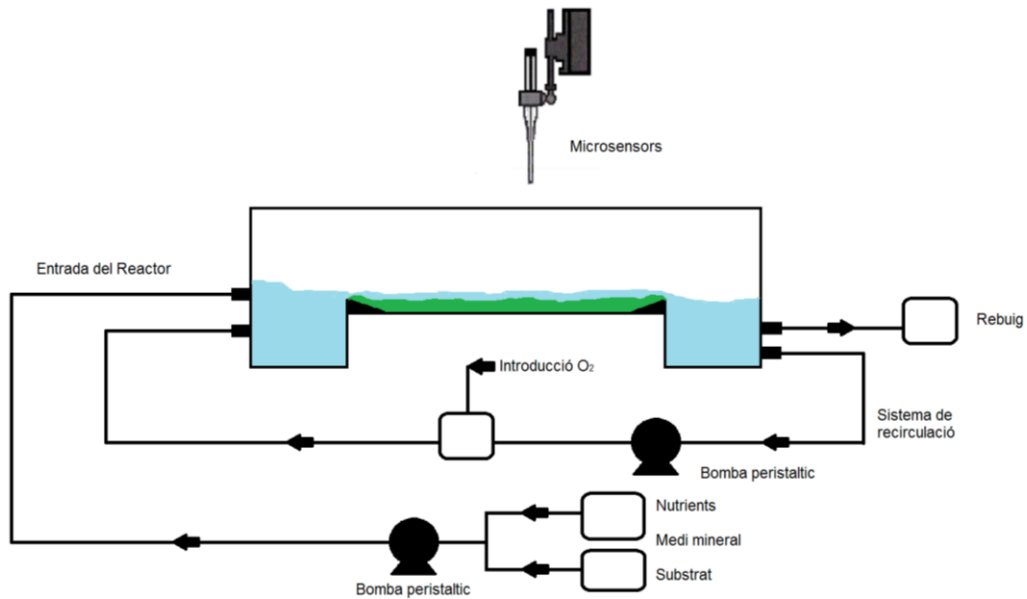


Figura 20. Configuració per mesurar oxigen dissolt

En canvi, per obtenir microperfils de pH com es pot veure en la Figura 21, l'única variació en comparació amb l'a configuració anterior és que en aquest cas s'han d'utilitzar dos microsensores en aquest cas Clarks on un fa de referència.

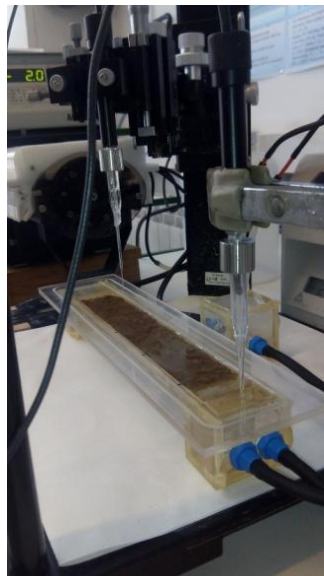


Figura 21. Sensors de pH en el reactor.

4.3.1.2 Bioreactor placa plana fase gas

El bioreactor de placa plana en fase gas, Figura 22, en comparació amb el de fase líquida, té més alçada en la placa plana pel fet de que pot circular líquid i/o gas. Degut a que hi pot circular gas, aquest bioreactor ha de tenir una tapa que eviti que hi hagin fuites i a la vegada permeti realitzar mesures en el seu interior. Té sis conductes per

on es poden introduir els microsensors. A l'igual que el de fase líquida també te dos pous un d'entrada i l'altre de sortida on cadascun disposa de dos connexions amb tubs que permet fluïditzar el líquid. A més a més, també hi ha una entrada i una sortida de gas.

La configuració d'aquest varia una mica al tenir la variant del gas, fent que el que canviï sigui la profunditat, augmentant-la perquè pugui circular un gas per sobre de la biopel·lícula i el líquid. L'altre variant a destacar és la tapa del reactor amb els sis forats per tal de que el gas no s'escapi perquè a la vegada permeti realitzar mesures en el mateix, com s'ha esmentat anteriorment.

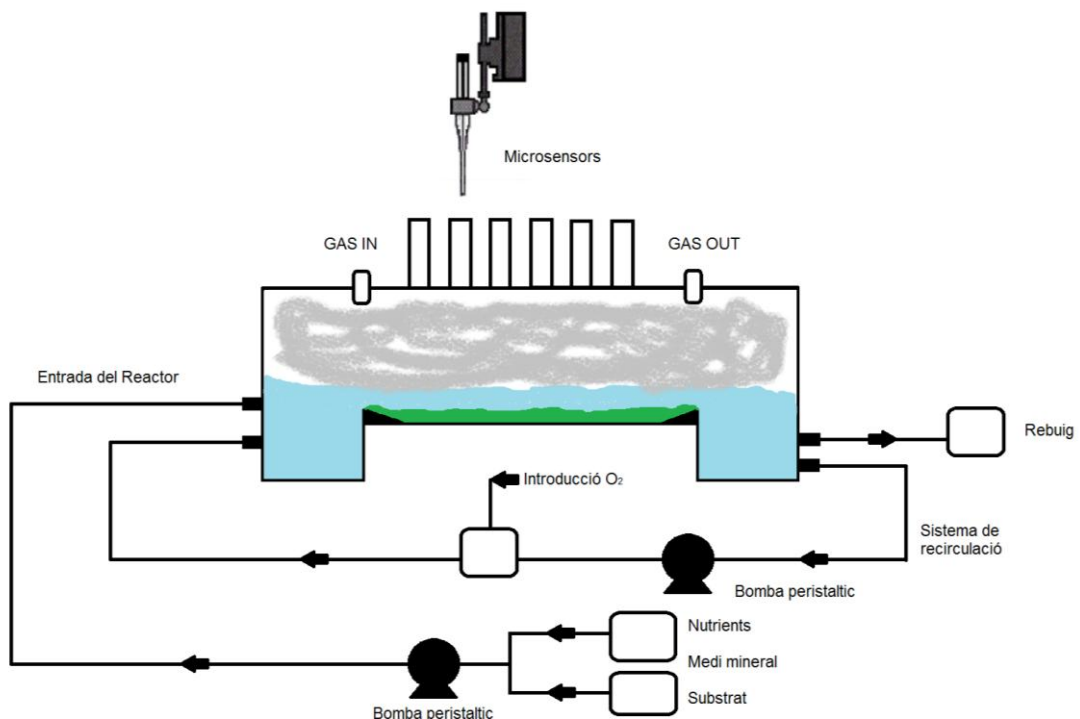


Figura 22. Bioreactor preparat per mesurar en la biopel·lícula com afecta el gas.

4.3.2 Biomassa utilitzada

En l'experimentació s'ha utilitzat dos tipus de biomassa. Biomassa heteròtrofa prové dels llots del reactor anaerobi de la EDAR de Sant Salvador de Guardiola i la biomassa autòtrofa (SO) prové del biofiltre percolador per al tractament de biogàs del grup de recerca GENOCOV de la UAB.

4.3.3 Medi mineral

El medi mineral que es vagi a utilitzar ha de ser l'adequat per al correcte desenvolupament del biosistema, per tant hem de diferenciar dos tipus de medis, un per un sistema heteròtrof i l'altre per un sistema autòtrof.

Seguidament, es mostra una taula del medi mineral per la biopel·lícula heteròtrofa, on es poden veure les proporcions adequades per el correcte creixement i funcionament de la biopel·lícula de forma controlada, aquestes proporcions han estat estudiades en (Dorado et al. 2012).

Taula 2. Especificació de les concentracions dels diferents compostos que formen el medi mineral per microorganismes heteròtrofs.

Compost	Concentració
KH_2PO_4	1g/L
K_2HPO_4	1g/L
NH_4Cl	1g/L
NaCl	1g/L
MgSO_4	0.2g/L
CaCl_2	0.02g/L

Un aspecte important és mencionar la falta de carboni en el medi mineral en qüestió, els microorganismes necessiten aquesta font de carboni que com s'ha esmentat abans que serà el substrat. Segons la relació de (Tchobanoglous et al. 1991), la relació de C:N:P ha de ser de 100:20:1, per tant s'han de fer una sèrie de càlculs per determinar quina concentració de substrat s'ha d'utilitzar, en el nostre cas, la glucosa té una concentració de 13 g/l.

Cal esmentar que si es fan canvis com per exemple en la concentració de substrat o directament fer variar el substrat això pot fer variar el creixement dels microorganismes i que doni pas al desenvolupament majoritari de fongs o d'altres, per tant s'ha de modificar el medi mineral amb el que es treballa depenent de les condicions del sistema. En l'experimentació es va treballar amb un canvi de glucosa, augmentant la seva concentració el doble, 26 g/l, fet que va provocar com s'ha dit abans el creixement de microorganismes no desitjables, acció obliga a canviar el medi mineral.

4.4 Procediment a seguir per a la mesura amb microsensores

En el monitoratge de les biopel·lícules amb els microsensores és necessari establir una bona configuració per fer que la presa de mesures sigui la més eficaç i repetitiva possible. El sistema experimental que s'utilitza és robust un cop es va a realitzar la mesura i és difícil trencar els microsensores durant el procés.

En aquest apartat es detallarà com és el nostre sistema i els components que el formen junt amb les seves funcions.

4.4.1 Micromanipulador

El micromanipulador, (Micromanipulator MM33-2 de Unisense), es tracta d'un aparell que ens permet posicionar el microsensor en el medi i realitzar mesures manualment gràcies a que es pot moure en tres dimensions amb una elevada precisió espacial (eix $Y \rightarrow 100 \mu\text{m}$, eix $X \rightarrow 100 \mu\text{m}$ i eix $Z \rightarrow 10 \mu\text{m}$). Ens permet col·locar dos sensors a la vegada en el seu capçal, i per una millor seguretat i estabilitat està muntat en una placa antivibracions.

4.4.2 Sistema electrònic

El sistema electrònic està format pels microsensores que van connectats a un multímetre que és l'encarregat de transferir la informació a una interfície on es visualitza i es registren els valors obtinguts en el programa Sensor trace basic 3.0. El multímetre que utilitzarem és el Microsensors Unisense, Multimeter.

A continuació es pot veure un esquema de com és el muntatge de la part electrònica del sistema en la Figura 23:



Figura 23. Sistema electrònic format per els microsensores el multímetre i el PC-interfície. (Guimerà et al. 2013)

4.4.2.1 Funcionament del programa d'adquisició pels Clark

4.4.2.1.1 Posada en marxa del programa

Abans de començar amb el programa, s'ha de comprovar que l'ordinador amb el qual es treballarà no entri en mode somni o pausa ja que pot causar errors en la connexió amb els aparells connectats i s'hauria de reiniciar el programa.

Un cop assegurat l'ordinador es passa a connectar tots els equips per a la seva posta a punt iniciem el programa, on se'ns obrirà la següent pestanya:

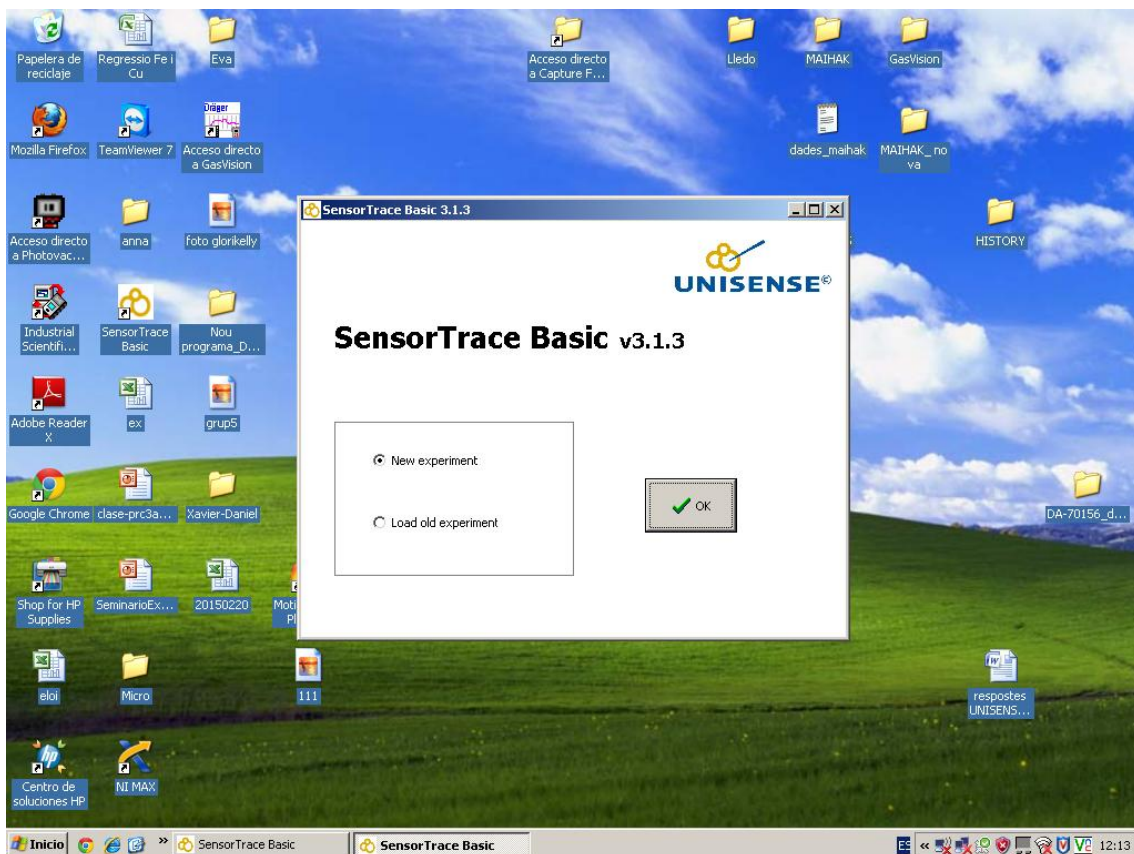


Figura 24. Finestra que en mostra el programa Sensor trace basic a l'hora de posar-lo en marxa.

S'ha d'escollir entre obrir un nou experiment o un vell, en el nostre cas sempre obrim un nou experiment.

4.4.2.1.2 Interfase del programa

La interfase del programa es divideix en dos àrees principals. Una zona inferior, on trobem una taula que ens mostra les senyals del sensor contínuament per generar una visió de tot l'experiment. En la secció de la banda es mostra totes les pestanyes del programa. L'àrea superior està dividida en pestanyes que permeten a l'usuari accedir a les diferents funcions del programa.

4.4.2.1.3 Fitxa de configuració

En la fitxa que podem veure en la Figura 25, trobem diferents paràmetres que per configurar segons el que vulguem mesurar, com es veu en la figura, les opcions que podem modificar són la del sensor que volem que treballi, tipus de sensor que és en quant a la seva mesura, les unitats que volem que ens mesuri, el rang dels valors, nom i comentari opcional del sensor.

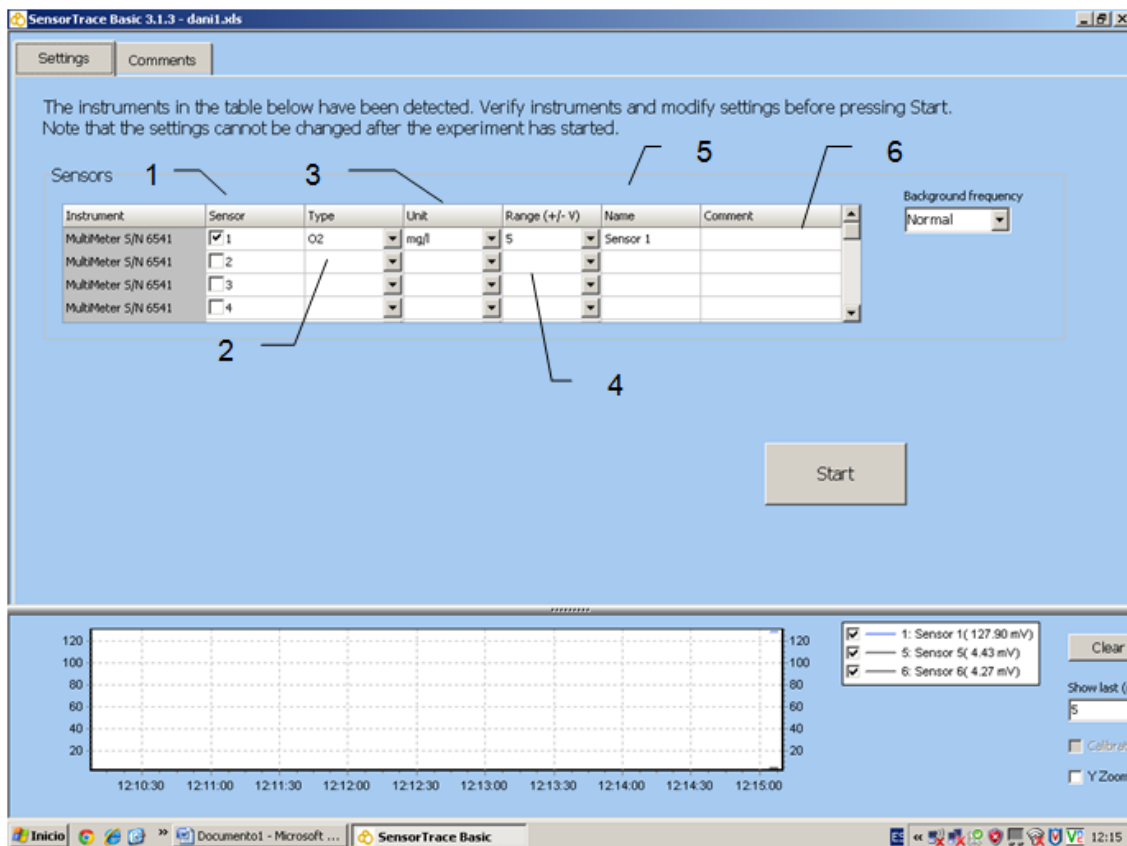


Figura 25. En aquesta figura podem observar les diferents opcions que ens deixa triar el programa, que són; (1) sensor amb el que es treballarà, (2) tipus de sensor amb el que es treballa, (3) unitats que volem que mesuri, (4) rang que ha de tenir de voltatge, (5) nom del sensor, (6) comentaris.

4.4.2.1.4 Taula de calibratge

Amb les mostres a punt per poder calibrar seleccionem el sensor que volem calibrar. Seguidament, canviem la concentració en el quadre de concentració amb la solució de calibratge. En el cas de que no hi hagi possibilitat de calcular oxigen amb una sonda d'oxigen el programa permet calcular aquesta concentració a partir d'un procés automatitzat per calcular la saturació de l'atmosfera a partir de la temperatura i de la salinitat de la solució del calibratge en la pestanya on posa O₂, Figura 27.

Amb la concentració correcta s'agrega el punt de calibratge polsant "Add point". Es poden afegir diferents punts amb diferents concentracions repetint el procés anterior per tenir la recta de calibratge. En el cas de que algun dels punts no siguin vàlids amb

el botó dret del ratolí es pot escollir “Delete point” per eliminar-lo, i polsant “Clean all points” s’eliminen tots els punts seleccionats.

Una vegada es tenen tots els punts desitjats per realitzar el calibratge amb el botó “Apply calibration” obtenim una recta de calibratge que serà la base per la conversió dels valors que obtinguem amb el microsensor escollit.

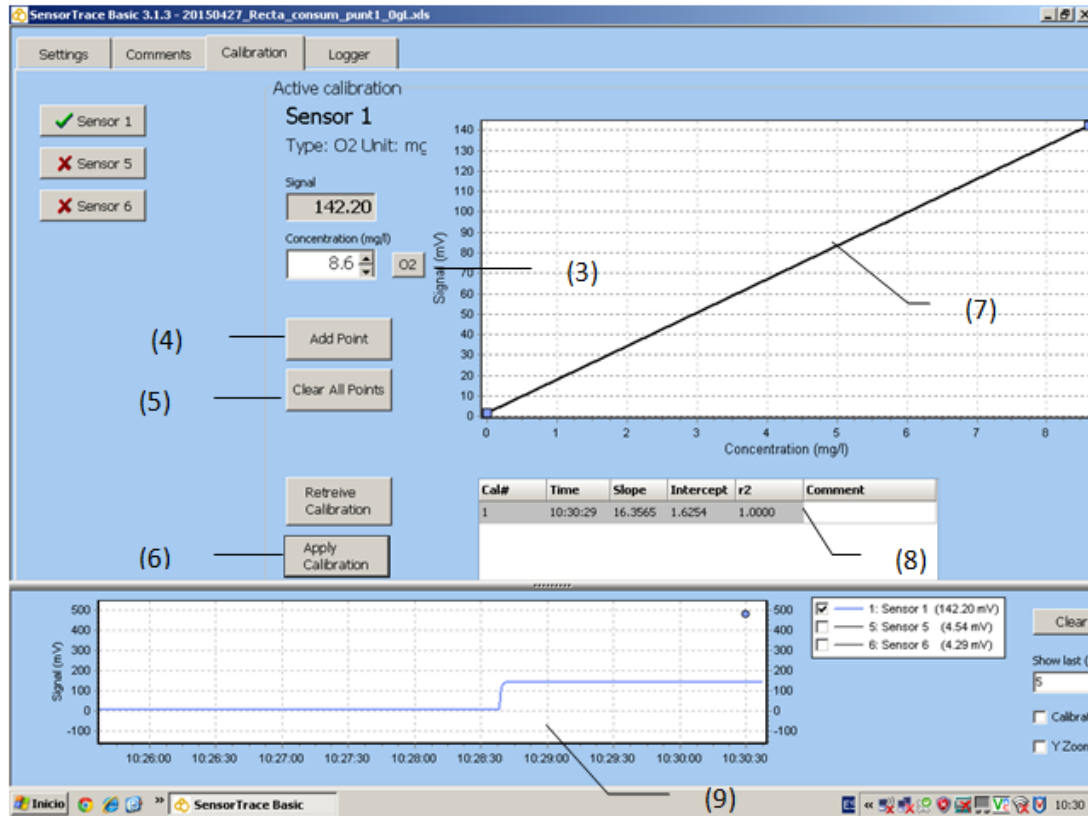


Figura 26. Impressió de la pantalla que es visualitza en el programa Sensor trace basic 3.0 quan es calibra. Explicació dels punts; (1) selecció del sensor, (2) mostreig de la senyal instantània que rep el sensor, (3) determinació de la concentració d’oxigen, (4) afegir punt per la recta de calibratge, (5) eliminació de tots els punts marcats en la recta de calibratge, (6) aplicació del calibratge a partir dels punts seleccionats, (7) visualització de la recta de calibratge, (8) dades de la recta de calibratge, (9) visualització general de la senyal del sensor.

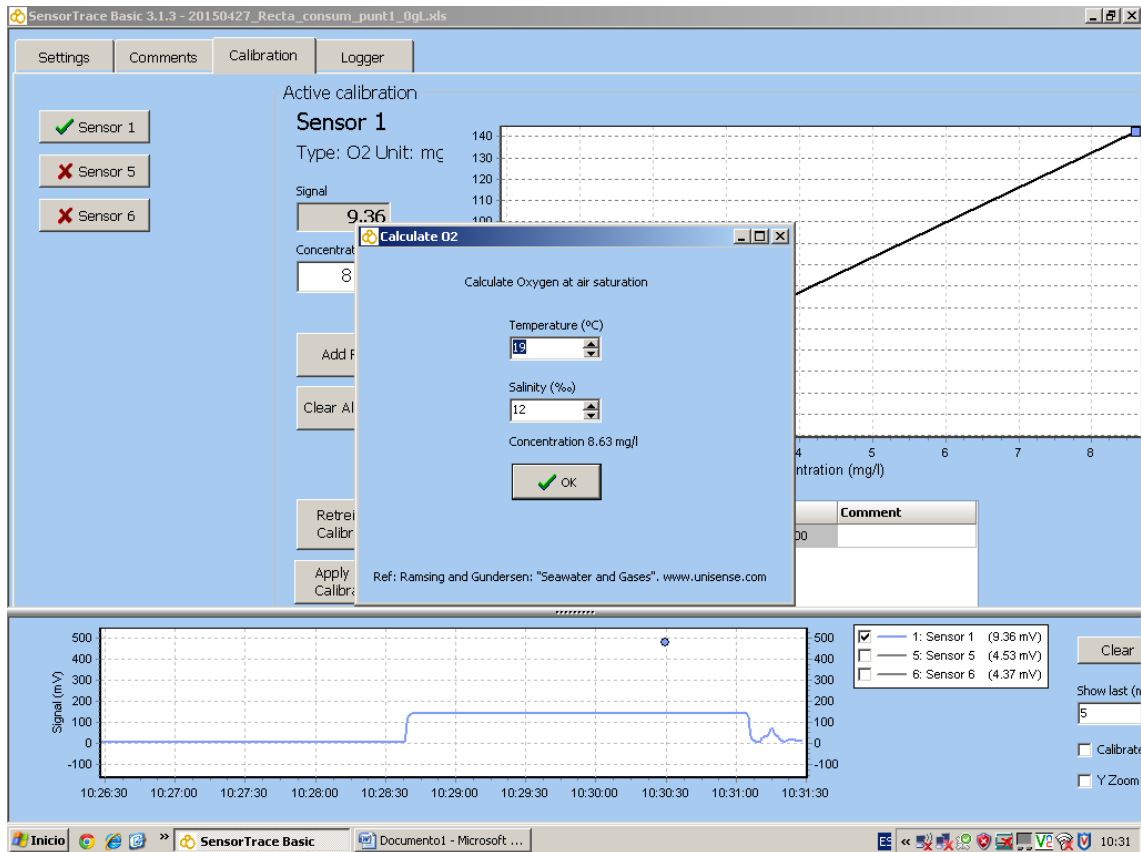


Figura 27. Mostreig del càlcul de la concentració de l'oxigen a partir del botó (3) de la Figura 26, on a partir de la temperatura i la salinitat automàticament el programa et calcula la concentració d'oxigen.

4.4.2.2 Funcionament del programa d'adquisició pels MEMS

El procediment del CHI1010C Electrochemical Analyzer per poder treballar amb els sensors descrits anteriorment ve determinat pels següents passos.

4.4.2.2.1 Voltametria cíclica

Per realitzar la voltametria cíclica s'ha d'anar a la barra d'eines que trobem al superior de la Figura 28, seleccionar l'opció de "set up", on ens apareixerà la possibilitat de triar tècniques de mesures, per tant, com el que volem primerament és realitzar la voltametria cíclica, triem aquesta opció i ens apareixerà el que es mostra en la Figura 28, on s'han de triar els elèctrodes que volem que funcionin per realitzar la tècnica i amb els voltatges corresponents. En el nostre cas vam utilitzar els paràmetres amb els valors que es mostren en la figura.

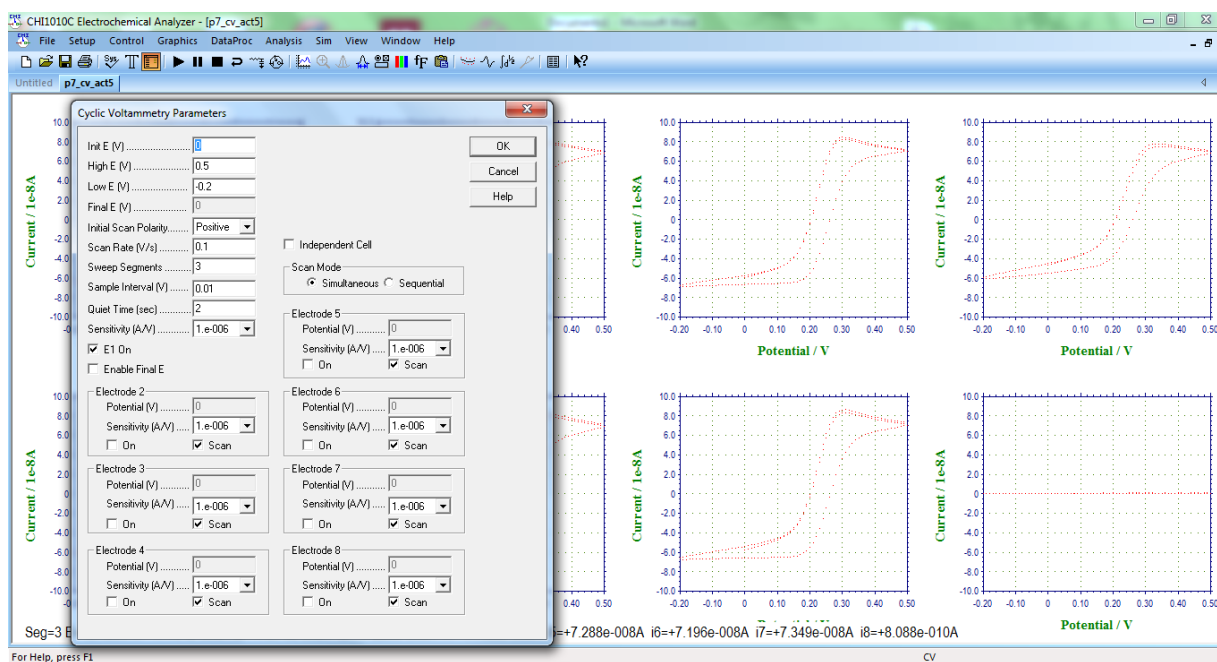


Figura 28. Tècnica de voltametria cíclica en el programa CHI1010C Electrochemical Analyzer

4.4.2.2.2 Linear Sweep

Amb la voltametria realitzada correctament, el pas següent en la utilització del programa és seleccionar la tècnica de Linear Sweep per saber en quin voltatge es compleixen les dos reaccions que es parlen en 3.7.4.

Per seleccionar la tècnica seguim els passos que la vegada anterior, i en apareixerà el següent menú on s'hauran de omplir els buits amb els paràmetres que es veuen en la imatge, d'aquesta forma, fem corre al programa i obtindrem el gràfic de la Figura 17.

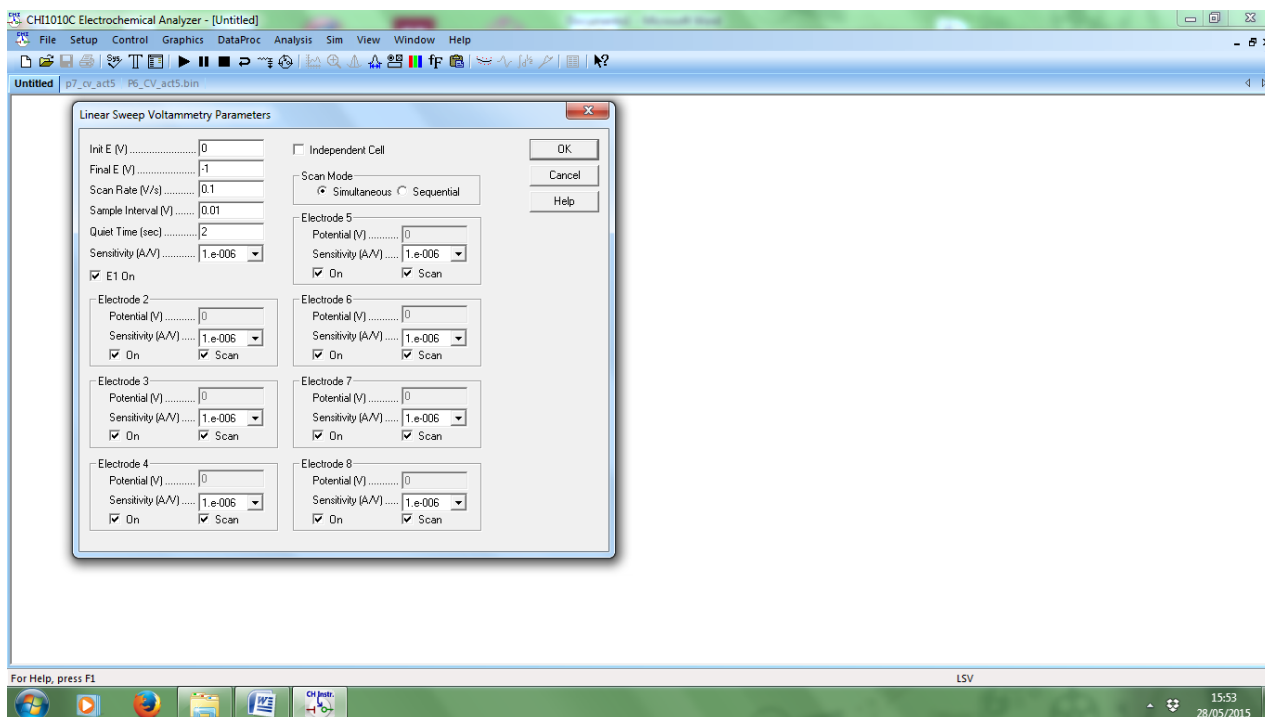


Figura 29. Programa amb la tècnica del Linear Sweep per obtenir el voltatge necessari perquè es produeixin les dos reaccions.

4.4.2.2.3 Mètode amperomètric

Per finalitzar, ens queda determinar la tècnica amperomètrica que ens permet obtenir els potencials que determinen els diferents elèctrodes del nostre microsesnor, que utilitzarem posteriorment per fer una recta de calibratge.

Per seleccionar la tècnica seguim els passos de les dos tècniques anteriors i seleccionem la tècnica amperomètrica. On se'ns mostrarà un menú igual que el de la Figura 30, on s'hauran d'introduir el voltatge obtingut en el Linear Sweep i seleccionar els elèctrodes de mesura. Un cop fet ja es pot corre el programa per obtenir diferents referències de voltatges amb diferents concentracions d'oxigen. El resultat final vindria a ser el de la Figura 18.

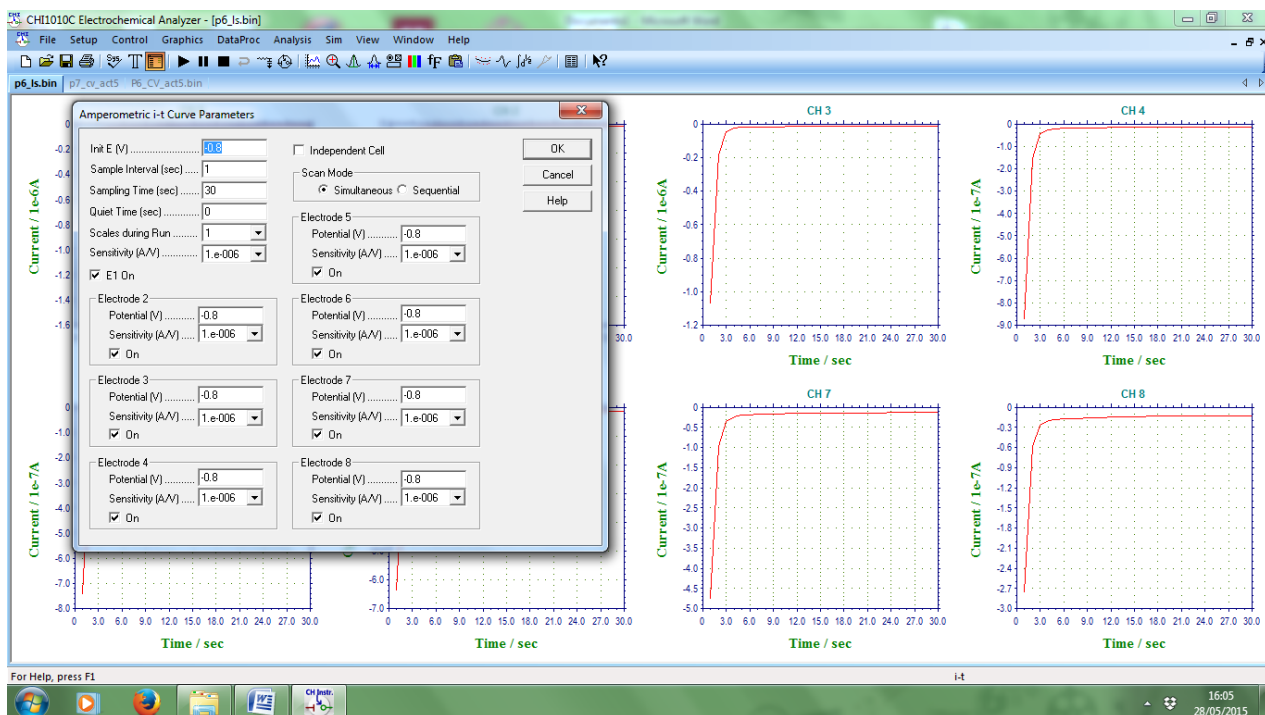


Figura 30. Programa amb la tècnica amperometrica per obtenir els gràfics que es veuen en el fons de la imatge per realitzar la recta de calibratge.

4.4.3 Mesura de perfils de concentració

En el següent apartat s'explica quins han estat els paràmetres a estudiar i el procediment que els hi correspon a cadascun saben que les configuracions varien segons els paràmetres a estudiar que són l'oxigen dissolt i el pH. Un dels principals punts a tenir en compte és que les mesures realitzades han de ser el màxim de repetitives possibles.

4.4.3.1 Monitoratge del perfil d'oxigen amb Clarks

En aquest apartat es detallarà quin ha estat el procediment seguit per la pressa de dades a l'hora de fer el perfil d'oxigen amb la utilització del microsensor Clark de O_2 .

Seguint l'esquema que es troba quan s'explica el bioreactor de placa plana, on prèviament s'ha d'haver realitzat l'activació i el calibratge del sensor. Es col·loca en el micromanipulador de forma que estigui totalment estable i que el marge de maniobra d'aquest permeti el contacte amb la biopel·lícula, com en la Figura 20. El següent pas és situar el sensor dins d'una secció determinada del reactor, una vegada situat, s'ha de baixar fins que la punta entri en contacte amb la fase líquida que flueix per sobre de la biopel·lícula. Un cop ja en contacte, amb el micromanipulador es va baixant 50 μm a la vegada que es prenen valors manualment sobre la concentració d'oxigen. Aquest procediment es realitza fins arribar al punt en que la concentració d'oxigen en la biopel·lícula és anòxica. Arribat a aquest punt, s'extreu el microsensor de la

biopel·lícula i es torna a situar en una altre secció diferent per tornar a repetir el procés i així tenir diferents perfils d'oxigen en la mateixa biopel·lícula per estudiar-los.

4.4.3.2 Monitoratge de perfils de pH amb Clarks

En aquest apartat es detalla com es realitza la pressa de dades dels perfils de pH dins de la biopel·lícula. Per començar a operar prèviament s'ha d'haver realitzat les tasques de activació i calibratge dels microsenors, on en aquest cas en tindrem dos, un de pH i l'altre de referència.

A l'igual que en l'apartat anterior, aquest tindrà el mateix esquema, però amb la variant del sensor de referència, Figura 21. Seguint el mateix procediment que en la descripció del bioreactor de placa plana en fase líquida, s'agafa el microsensor de pH i es situa en el micromanipulador de forma que quedi ben subjecte i estable. Una vegada col·locat el microsensor de pH en una de les diferents seccions del reactor, es col·loca el microsensor de referència que ha d'estar immòbil i en contacte amb el medi que té la biopel·lícula com es pot observar en la Figura 21. Un cop realitzat aquestes dos operacions es baixa el microsensor de pH amb el micromanipulador fins que entra en contacte amb la fase líquida. Un cop ja en contacte amb la fase líquida es va baixant 50 μm fins que el pH de la biopel·lícula és pràcticament constant o fins la mateixa profunditat en la que l'oxigen és nul. Finalitzat el monitoratge de la secció en qüestió, es passa a realitzar el mateix procediment per les altres per obtenir diferents perfils de pH de la mateixa biopel·lícula en les mateixes condicions.

4.4.3.3 Monitoratge de la biopel·lícula amb els MEMS

A continuació, s'explicarà com es realitzen les presses de dades a partir dels microsenors MEMS. Al igual que en el cas dels Clarks l'objectiu d'aquests és detectar quin és l'oxigen dissolt en el medi d'estudi, però en el cas d'aquests microsenors no es realitzarà el mateix procediment que en l'anterior.

Realitzat el calibratge, és passa al monitoratge dels perfils. El procediment es basa en deixar el microsensor MEMS en una posició determinada per un perfil previ amb els Clark per saber a quina profunditat hem de baixar el microsensor MEMS. Una vegada introduït el microsenor, s'afegeixen els dos ànodes on han d'estar en contacte amb el mateix medi, i com a menys distància del microsenor MEMS millor, també es pot utilitzar l'elèctrode intern en comptes de utilitzar les dos ànodes, quan aquest està recobert per Nafion. Seguidament, amb tot el sistema connectat i perfectament situat, posem en marxa el programa CHI1010C Electrochemical Analyzer i deixem que el microsensor vagi agafant dades que seran tractades un cop finalitzi.

4.5 Simulació a partir del model de la biopel·lícula

Per al desenvolupament d'un model que ens permeti descriure el funcionament de la biopel·lícula necessitarem identificar la reacció que hi té lloc en el nostre sistema a la vegada de la difusió. En aquest apartat es detallaran les equacions que formen part del transport de matèria i la cinètica del model adoptat. El nostre model es basa en la difusió del oxigen dins de la biopel·lícula, per tant necessitarem l'equació de difusió i reacció.

La difusió ve donada per quan hi ha unes diferències de concentracions i la primera llei de Fick ens demostra com podem treballar, però amb l'inconvenient de que és en estat estacionari. En el nostre cas treballem en estat no estacionari perquè el flux i el gradient de concentració varien en el temps i per tant l'equació que utilitzarem en aquesta situació serà la de la segona llei de Fick (Heymes et al. 2006), l'equació 3:

$$\frac{dC}{dt} = D \cdot \frac{d^2 C}{dx^2} \quad \text{Equació 3}$$

Per definir la biocinètica en el nostre cas ens hem decidit per triar Monod per desenvolupar un model que descriu quina ha estat l'activitat metabòlica que hi ha hagut en el sistema que ve definida seguidament:

$$\frac{dC}{dt} = K \cdot C \quad \text{Equació 4}$$

Per determinar el nostre model el que farem serà correlacionar les dues funcions anteriors per obtenir l'equació final que és la que utilitzarem en el nostre model per saber com treballen els microorganismes en les diferents condicions que proposarem en les experimentacions.

$$D \cdot \frac{d^2 C}{dx^2} = K \cdot C \quad \text{Equació 5}$$

La simulació en el modelatge de la concentració d'oxigen en els perfils obtinguts es realitza mitjançant l'equació 5, descrita en l'apartat de model. La resolució d'aquest es durà a terme amb la utilització del programa Matlab on amb una funció ODE (equacions diferencials ordinàries) de primer ordre podrem obtenir els resultats dels paràmetres en qüestió i les condicions de contorn.

4.6 Mètode per a la determinació de la biocinètica i el càlcul de la biomassa

La idea del present apartat és poder calcular la velocitat de consum de l'oxigen (OUR) a partir d'un ajust de perfils que s'adeqüin de la millor manera a les condicions reals de mesura. Ja que els sistemes immobilitzats tenen més resistència a la transferència de matèria, com les condicions reals, el que farem en aquesta part experimental serà observar la variació que es produeix en el consum d'oxigen quan es realitzen canvis en la concentració de substrat, en el nostre cas la glucosa. Per començar amb l'experimentació es va decidir dur a terme amb una concentració endògena i anar augmentant la concentració de glucosa en 2 g/l fins arribar a la de 14 g/l, per així obtenir diferents punts per poder observar la corba de consum.

La realització de l'experiment consisteix en mesurar la concentració de l'oxigen de la mateixa manera que s'explica en el punt 4.4.3.1 i, en aquest cas, com en els anteriors, quan la concentració d'oxigen arriba a zero s'acaba el perfil. Es mesurarà dues vegades en el mateix punt, de tal manera que obtindrem dos perfils en un sol punt i això es farà amb tres punts diferents, localitzables en punts en que la biopel·lícula es veia en bones condicions, independentment de la secció on es trobés. Això es repetia per a cada càrrega de substrat diferent.

Gràcies a l'equació 6 que tenim a continuació podrem ajustar el model i obtenir els valors de la velocitat de consum:

$$OUR_{biopel·lícula} = D_B \cdot \frac{\partial^2 OD}{\partial X^2} \quad \text{Equació 6}$$

Per acabar de modelitzar el sistema, cal que sigui determinats els valors de q_o i de K_s , de forma que cal aplicar la corba, Figura 5, a partir de l'equació anterior obtindrem la OUR i, sabent la quantitat de biomassa, podrem obtenir els paràmetres per determinar l'afinitat que té el nostre biosistema amb el contaminant.

$$q_o = \frac{OUR}{X} \quad \text{Equació 7}$$

Abans d'aplicar la formula anterior, ens cal determinar la biomassa que tenim en el nostre sistema. Per poder fer-ho, utilitzarem el mètode que està descrit a continuació per saber quina quantitat de proteïnes el componen. Posteriorment, s'aplica una correlació on es relaciona la biomassa amb les proteïnes i ja es pot obtenir el valor de q_o , per dibuixar la corba de consum d'oxigen.

Per realitzar aquest procés utilitzarem el mètode Bradford, que es basa en fer reaccionar les mostres amb un reactiu d'un colorant hidrofòbic (Blau de Coomassie G-250) que al interaccionar amb una proteïna origina un color blau intens.

Materials

- Espectrofotòmetre (Perkinelmer, Lambda 25)
- Tubs d'assaig amb tap
- Centrifuga
- Hidròxid de sodi 1M
- Metràs a forat 100 ml
- Albúmina
- Reactiu de Bradford
- Bany
- Vòrtex
- Pipeta de 1 ml
- Balança
- Gradetes
- Aigua
- Vasos de precipitats

Recta de calibrat

Per a la preparació mare es dissolen 500 mg d'albúmina en 90 ml d'aigua i s'enrasa en un metràs de 100 ml. Aquesta solució té 5000 ppm de albúmina, per evitar el seu deteriorament es guarda a la nevera.

Partint de la solució mare es prepara una solució de 1000 ppm en un tub d'assaig, per a preparar-la s'utilitzen 0,5 ml de la solució mare i 4,5 ml d'aigua.

A continuació es preparen patrons de 100, 200, 400, 600 i 800 ppm juntament amb els dos blancs tal i com es mostra en la següent taula:

Concentració (ppm)	Solució 1000 ppm (ml)	Aigua (ml)
100	0.1	0.9
200	0.2	0.8
400	0.4	0.6
600	0.6	0.4
800	0.8	0.2

1000	1	0
0	0	1
0	0	1

Un cop preparats els patrons es tapen i s'homogeneïtzen amb l'ajut del vòrtex. Un cop homogeneïtzades les solucions s'agafa 0,1 ml de cada una i es traspassa a un nou tub d'assaig. Un cop finalitzat s'hi afegeixen 3 ml del reactiu Bradford, s'homogeneïtzen novament els patrons i es deixa reaccionar durant 10 min a temperatura ambient. Finalment es procedeix a fer la lectura a l'espectrofotòmetre. A 595 nm.

Els resultats obtinguts per la recta patró són:

Concentració (ppm)	Absorbància
100	-0.06614
200	-0.1012
300	-0.1661
400	-0.2490
500	-0.2880

Preparació de la mostra

En tubs d'assaig amb tap es posa 1 ml de la mostra i es centrifuga durant 15 min a una velocitat de 8. Es prepara un bany maria a 100°C i s'omple d'aigua fins a una altura que permeti cobrir la meitat del tub d'assaig. Un cop para la centrifuga es retiren els tubs i es llença el sobrenedant. A continuació s'afegeix 1 ml d'hidròxid de sodi 1M i es resuspèn el pèl·let utilitzant el vòrtex. A continuació es retolen els tubs amb el numero de la mostra i es cobreix amb una cinta adhesiva, per evitar que s'esborri el numera en el bany maria. Tot seguit es tapen els tubs i s'introdueix la gradeta al bany maria durant 5 minuts. Transcorregut aquests temps es treu la gradeta amb els tubs de bany maria i es deixen refredar. Un cop refredats es tornen a homogeneïtzar amb el vòrtex i se'n extreuen 0,1 ml que es pesen en un tub d'assaig amb 3 ml del reactiu de Bradford. Es deixa reaccionar el reactiu durant 10 min i es realitza la lectura a l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 595 nm.

4.7 Determinació de paràmetres

La determinació de paràmetres en el model es realitzarà seguint l'algoritme que trobem a continuació en la Figura 31:

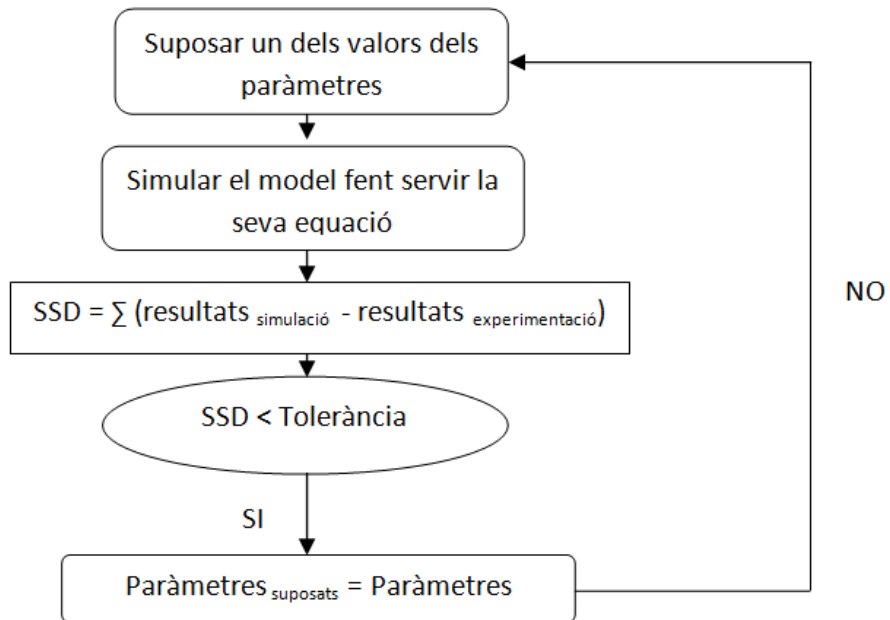


Figura 31. Diagrama que segueix el model per el processament de dades.

5. Resultats

5.1 Monitorització de la biopel·lícula amb microsensores Clarks

Per a la correcta caracterització de les biopel·lícules, el que hem realitzat en aquest treball ha estat un estudi en el que a partir de la biopel·lícula immobilitzada en el reactor, s'han fet una sèrie de variacions en el sistema. Aquestes variacions són provocades per veure la resposta del sistema en realitzar el canvi.

Es realitzen variacions de concentració del substrat que s'introdueixen en el reactor de placa plana. En el nostre cas el substrat és la glucosa, i el rang de variació en el que hem treballat ha estat des de condicions endògenes fins a 26 g/l de glucosa. Amb aquestes concentracions ens assegurem no hi ha limitació per substrat.

L'objectiu d'aquesta part de l'estudi és determinar el comportament del nostre sistema a partir de les variacions realitzades en el substrat d'entrada mitjançant del model desenvolupat en el punt 4.5.

5.1.1 Caracterització de la biopel·lícula

Per a la caracterització de la biopel·lícula realitzarem diferents perfils d'oxigen dissolt, pH i mesures amb el sensor DUMMY. Per obtenir els perfils d'oxigen dissolt utilitzarem la configuració de bioreactor de placa plana en fase líquida seguint els passos del monitoratge de perfils d'oxigen. Els perfils de pH es van proposar amb uns quants dies d'experimentació ja començats, per això no tots els perfils tenen aquestes mesures. Per aconseguir els perfils de pH es va utilitzar la mateixa configuració en la part anterior i seguint els mateixos passos del monitoratge. Per finalitzar, les mesures agafades amb el sensor DUMMY, que és un sensor de prova amb agulla rígida, les utilitzarem per determinar el gruix de la biopel·lícula.

Cal dir que tots els perfils i les mesures s'han intentat realitzar de forma repetitiva en diferents moment d'operació amb diferents condicions per estudiar la seva resposta i comparar els resultats.

5.1.1.1 Identificació de les diferents fases al reactor

En aquest apartat del treball determinarem, a partir dels diferents perfils obtinguts experimentalment, les diferents fases al reactor, que són les següents: la fase líquida, la interfase i la biopel·lícula. Per poder diferenciar-les el que farem serà seguir el procediment descrit per W, Horn, Hempel (2002) que, tal i com s'observa en la Figura

4, les diferents fases de la biopel·lícula es poden diferenciar fàcilment. El que es farà amb els perfils, que van des de la fase líquida fins al punt anòxic de la biopel·lícula, és relacionar cada punt amb la seva fase. El que s'espera obtenir en els perfils, és que l'oxigen dissolt en el líquid vagi disminuint molt poc a poc, de forma que sigui gairebé constant. A l'arribar a la interfase es nota un canvi de pendent i comença a disminuir la concentració de l'oxigen i, finalment, quan el micorsensor ha entrat en la biopel·lícula, la concentració d'oxigen baixa molt per cada mesura agafada i, conseqüentment, el pendent ha de ser més inclinat.

Utilitzant les dades experimentals i el procediment anterior, grafiquem un dels perfils mesurats al laboratori, on es pot observar perfectament les diferents fases comentades anteriorment. Cal puntualitzar que per a tots els perfils realitzats hem repetit el mateix sistema. Per consultar la resta dels perfils els podreu trobar a l'Apèndix 1: Perfils per a la identificació de les diferents fases del reactor.

El següent gràfic conté la concentració d'oxigen dissolt en ppm en l'eix d'ordenades i amb la profunditat en μm en l'eix d'abscisses. És un dels primers perfils que es van realitzar i es pot visualitzar la fase líquida i la fase de la biopel·lícula, per d'aquesta manera localitzar on es troba la interfase:

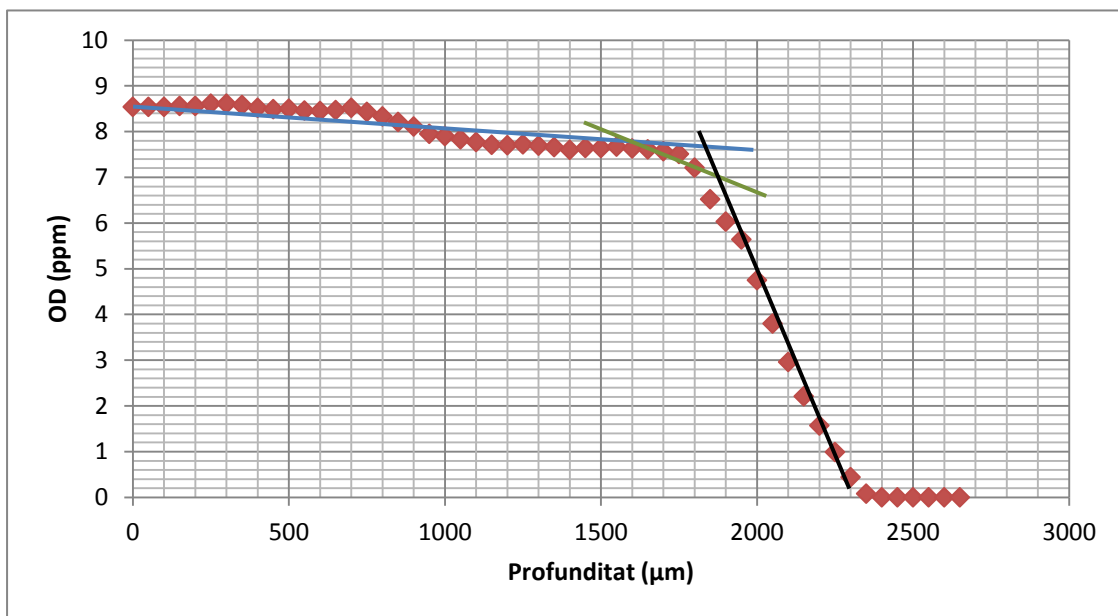


Figura 32. Gràfic del perfil d'oxigen dissolt mitjançant els microsensores Clark de la biopel·lícula en condicions endògenes en el dia 6 d'experimentació. Es detalla la zona líquida amb una línia blava, la interfase amb una línia verda i la zona de biopel·lícula activa amb la negra.

El que es pretén observar en aquest experiment és la resistència que influeix la biopel·lícula a la difusió de l'oxigen. Com s'ha explicat en els apartats de caracterització de la biopel·lícula i transferència de matèria, la difusió del oxigen en el biofilm és un paràmetre molt important que afecta a la cinètica i al consum de substrat i que en el nostre cas és clau per a caracteritzar-les.

Estudiant els perfils obtinguts, la predisposició que ha de seguir l'oxigen dissolt en la biopel·lícula ha de ser, primerament, una zona on la concentració d'oxigen es manté constant i les mesures encara s'estan realitzant en la fase líquida, aquesta fase constant és la que està marcada en la Figura 32 per la línia blava. Seguidament, la concentració ha de començar a disminuir al arribar a la interfase, des que comença aquesta disminució fins que la tendència del perfil es fa més inclinada és la zona que marcarem amb la línia verda, indicant que és la interfase de la biopel·lícula. Per finalitzar, la concentració d'oxigen ha de baixar amb un pendent més gran indicant que aquest ha arribat al punt on ja està en contacte amb la biopel·lícula que és on l'oxigen li és més difícil difondre's a mesura que augmenta la profunditat com es mostra en la Figura 32 i, com era d'esperar, aquesta zona es marca en el perfil amb la línia negra on es visualitza la disminució progressiva del perfil d'oxigen dissolt en la biopel·lícula.

Si analitzem els perfils de les diferents experimentacions, quan ens trobem en els primers dies, com es el cas de la Figura 32, l'oxigen dissolt es manté estable durant més profunditat en comparació als perfils mesurats en dies més avançats de l'experimentació, que a poca profunditat d'haver introduït el sensor en el medi, ja comença a disminuir l'oxigen dissolt. Si ens centrem a comparar les seccions dels diferents perfils veiem que no segueixen una tendència específica entre elles, és a dir, la secció 1 de la Figura 32, que es troba en condicions endògenes, no s'assembla a la secció 1 d'un perfil amb una càrrega de substrat de 12 g/l de glucosa, ja que són dos maneres diferents d'operar. Un altre fet que podem destacar es l'estabilitat que ens mostra el sistema, els perfils dels primers dies mostren un comportament més estable en quant a difusió d'oxigen a mesura que augmenta la profunditat i, en canvi, en dies d'experimentació més avançats la profunditat on finalitza l'oxigen dissolt és més gran i a la vegada variable sent d'aquesta manera un sistema més inestable. El deteriorament de la biopel·lícula pot ser un dels motius d'aquesta inestabilitat, junt amb el creixement d'altres espècies, com fongs.

En el present apartat de l'experimentació també es van realitzar mesures de pH en el sistema, com s'ha comentat anteriorment interessa estudiar la resposta d'aquest. El que es veu en aquest perfil de pH és que no hi ha gran variació en la biopel·lícula i que

es manté un pH constant a mesura que s'augmenta de profunditat en tots els casos experimentals. A continuació s'exposarà un exemple de pH que es va mesurar com tots els altres en els que es va treballar en condicions endògenes en el dia 22 d'experimentació. Per consultar la resta del perfils de pH anar al mateix apèndix que en el cas anterior.

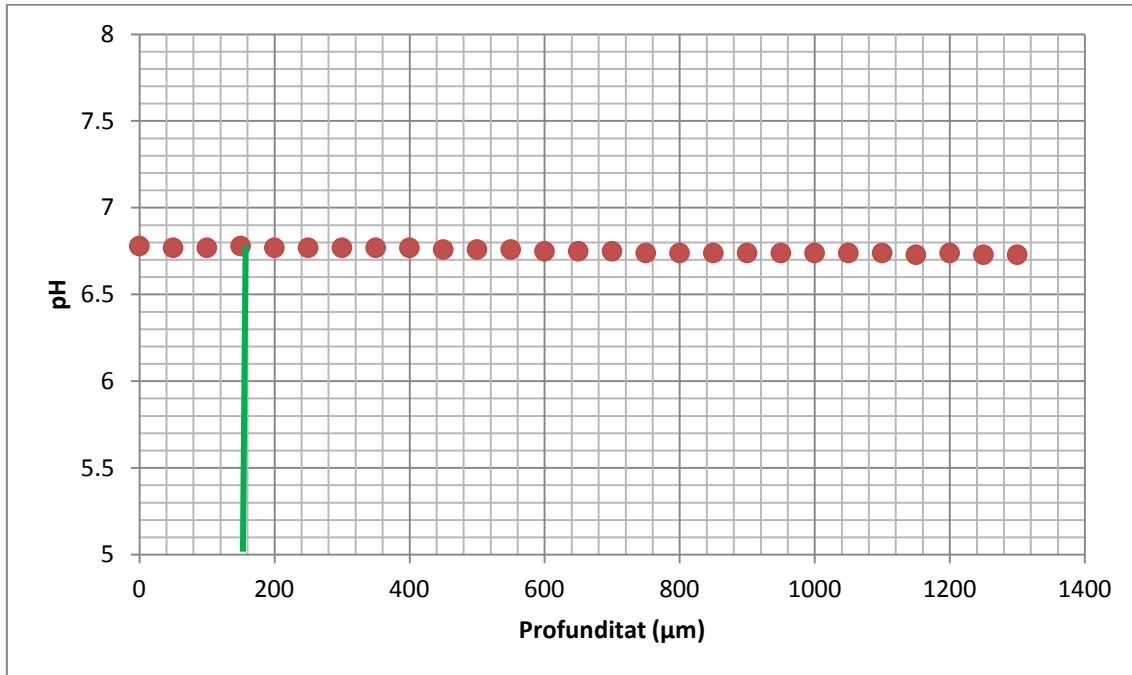


Figura 33. Gràfic que ens mostra el pH mesurat en el perfil del dia 22 d'experimentació amb la biopel·lícula en condicions endògenes. En el gràfic es pot veure el pH a mesura que augmenta la profunditat, en el perfil realitzat en la biopel·lícula. La línia verda, indica que ja ha fet el canvi de fase i les mesures que es fan a continuació, són mesures en la biopel·lícula.

El pH del sistema que correspon al perfil mostrat en la Figura 33 no varia entre les seccions, però sí que varia en comparar les condicions endògenes amb les de substrat amb glucosa. Estudiant el pH durant un període de 13 dies amb la presa de dades de 7 experimentacions diferents, com s'ha pogut veure en la Figura 33, el pH es manté estable i a la vora del valor 7 en condicions endògenes i en canvi al subministrat substrat el valor d'aquest es torna més àcid a la vora del valor 5, però també estable, sense variar molt a mesura que augmenta la profunditat de la biopel·lícula. Però s'ha de comentar que hi ha una tendència a disminuir el valor de pH, ja que al principi de la mesura es comença amb el valor de pH més alt que al final de la mesura.

Per estudiar més a fons el creixement de la biopel·lícula es van realitzar presa de dades durant un període de temps per veure com evolucionava. El que es va fer va ser calcular amb el sensor DUMMY la profunditat que hi ha des de que es toca el líquid fins que arriba al final del reactor. Seguidament, es mostra un gràfic on es veuen reflectits els valors de la profunditat en l'experimentació del dia 6:

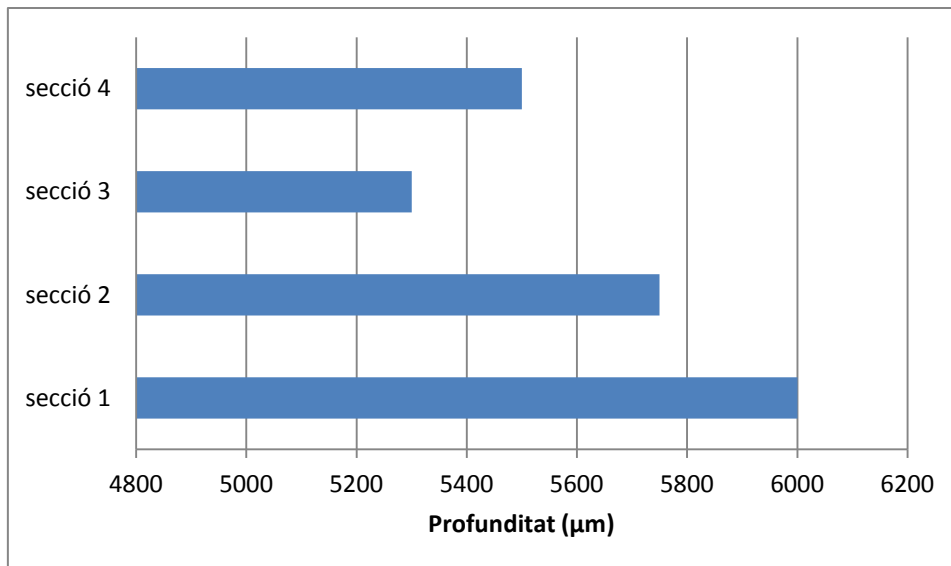


Figura 34. Mostreig de la profunditat que s'ha mesurat amb el sensor DUMMY des del líquid fins la biopel·lícula.

Observant tots els perfils mesurats amb el sensor DUMMY, podem dir que la profunditat augmenta progressivament a mesura que es va avançant en els dies de l'experimentació, per tant, com hem comentat anteriorment la biopel·lícula creix amb el pas dels dies, augmentant el seu gruix.

5.1.1.2 Determinació de la biopel·lícula aeròbia

Finalitzada la determinació de les diferents fases dels perfils obtinguts en les experimentacions realitzades, el que fem és estudiar l'activitat metabòlica de cada perfil a partir de la biopel·lícula aeròbia, la part on es troben els microorganismes que consumeixen oxigen per això el seu consum és més progressiu com s'ha pogut observar en els anteriors gràfics.

Per fer-ho, es seleccionarà una zona concreta que està delimitada pel punt que talla la línia verda amb la negra, fins que la concentració d'oxigen arriba a 0 ppm. Un cop fet això es mostra en un gràfic el resultat obtingut amb la concentració d'oxigen (ppm) en l'eix d'ordenades i la profunditat en μm en l'eix d'abscisses.

En el següent gràfic es pot veure el resultat de seleccionar la biopel·lícula aeròbia del dia 6 d'experimentació que es mostrava en la Figura 32, i del dia d'experimentació 22 de la Figura 33. Per visualitzar la resta de perfils anar a l'Apèndix 2: Perfils per a la determinació de la biopel·lícula aeròbia.

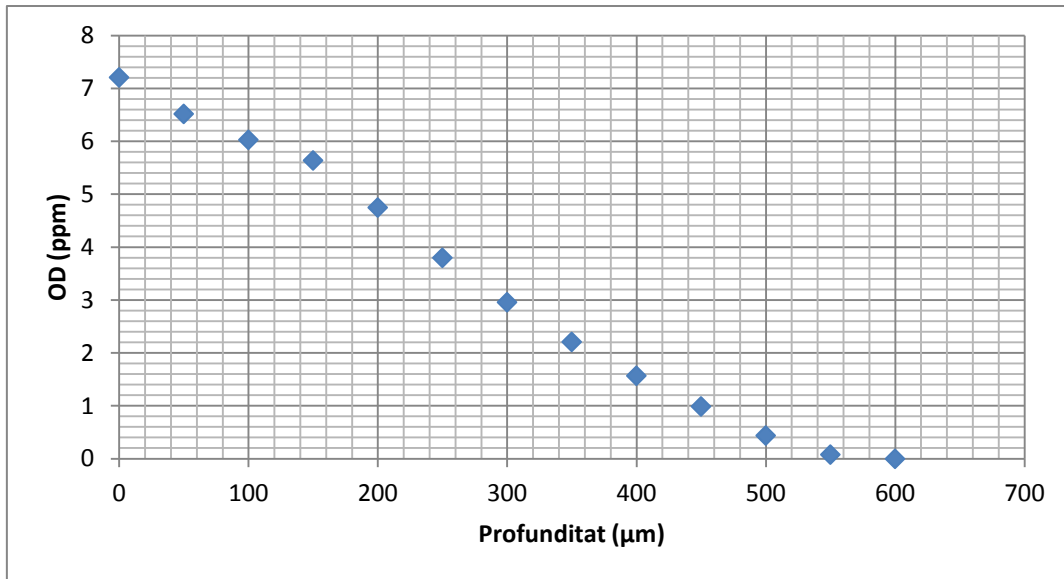


Figura 35. Zona aeròbia de la biopel·lícula dels perfils realitzats el dia 6 d'experimentació en condicions endògenes. Aquesta figura correspon al perfil de la secció 1.

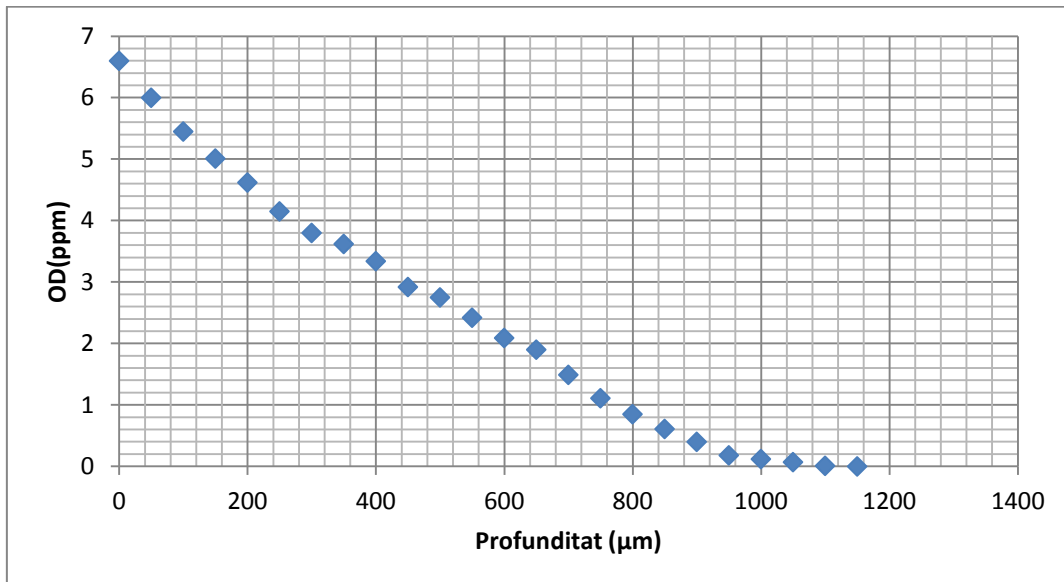


Figura 36. Zona aeròbia de la biopel·lícula dels perfils realitzats el dia 22 d'experimentació en condicions endògenes. Aquesta figura correspon al perfil de la secció 2.

És interessant observar que encara que el sistema es troba en condicions endògenes hi ha consum d'oxigen en ell. Considerem que una zona és aeròbica quan hi ha oxigen i aquest es consumit per els microorganismes. Tenint en compte aquest concepte i amb la dificultat de difusió que presenta el sistema, la concentració disminuirà, fins arribar a la zona no aeròbica. Considerem que una zona és anaeròbia quan no hi ha oxigen i, per tant, no els microorganismes no el poden consumir. En les figures anteriors es pot veure l'evolució de la zona aeròbia fins arribar a la zona anaeròbia, on no hi ha oxigen.

A l'analitzar la biopel·lícula aeròbia el que s'espera és un progressiu consum d'oxigen de forma que el pendent d'aquest sigui molt semblant des del principi fins al final. La tendència de l'oxigen en la biopel·lícula ha de disminuir a mesura que augmenta la profunditat; aquesta condició la compleixen el conjunt de figures anteriors. La tendència descrita anteriorment es compleix sempre, però amb variacions depenent de la càrrega de substrat que se li estigui assignant a la biopel·lícula. Els perfils amb condicions endògenes són bastant semblants entre les diferents seccions i segueixen una tendència clara. En canvi, quan es comença a subministrar substrat la tendència ja deixa de ser tan clara. La càrrega de substrat també afecta a la profunditat, al principi de les experimentacions, tots els perfils acaben casi a la mateixa profunditat, tanmateix, amb el pas dels dies, en les experimentacions s'observa com la profunditat varia bastant entre les seves diferents seccions.

Si observem les concentracions d'oxigen amb les que comencen el consum en la zona de la biopel·lícula aeròbia, en el perfil de la Figura 35, s'observa que comencen amb la mateixa concentració d'oxigen i que en canvi en la Figura 36 varia en algunes seccions, per visualitzar-los anar a l'apèndix.

Tots aquests fenòmens que s'han donat en les figures anteriors poden ser deguts a que la biopel·lícula és heterogènia i, per tant, no és igual en totes les seves seccions. La pressa de dades sempre s'ha volgut fer de forma repetitiva per obtenir els valors més semblants possibles, però encara que s'intentava agafar les dades dels perfils en els mateixos punts, la biopel·lícula és un sistema viu en el qual es produeixen canvis com desprendiments de biopel·lícules i desplaçament d'algunes zones, per això no sempre és pot repetir la mesura en el mateix punt exacte. Això es degut a la hidrodinàmica del sistema. També cal recordar que la biopel·lícula és un sistema viu i aquest va creixent. Per aquest motiu, cada vegada que la biocapa augmenta en el reactor, també ho fa la profunditat aeròbia.

Aquesta part del perfil és la que s'utilitzarà per realitzar monitorització de l'activitat de la biopel·lícula, ja que és la que realitza les accions metabòliques i és d'on obtindrem la informació sobre com és el funcionament de la biopel·lícula.

5.1.1.3 Modelització de l'activitat de la biopel·lícula

Determinada la part aeròbia de la biopel·lícula de tots els perfils que es van obtenir en els 35 dies d'experimentació el que vam fer a continuació va ser processar totes les dades per poder-les tractar a partir del model descrit en el punt 4.5, gràcies a aquest model, de cada perfil sabrem el que consumeix degut a la seva activitat metabòlica. A

partir de l'equació 14, que tenim seguidament, on es té en compte un valor de resistència de difusió amb la concentració del sistema, podrem extreure el valor de la $K \text{ (s}^{-1}\text{)}$, que és l'activitat metabòlica, amb el programa de Matlab que seguirà l'esquema determinat en la Figura 31.

$$D \cdot \frac{d^2C}{dx^2} = K \cdot C \quad \text{Equació 5}$$

El model el que fa és realitzar una simulació per aproximar el màxim possible les dades experimentals amb les del model i així obtenir el valor simulat de l'activitat metabòlica de cada perfil. A continuació es mostra un exemple de simulació del primer perfil que es va realitzar en les seves diferents seccions, per veure les altres seccions anar a l'Apèndix 3: Models de l'activitat de la biopel·lícula.

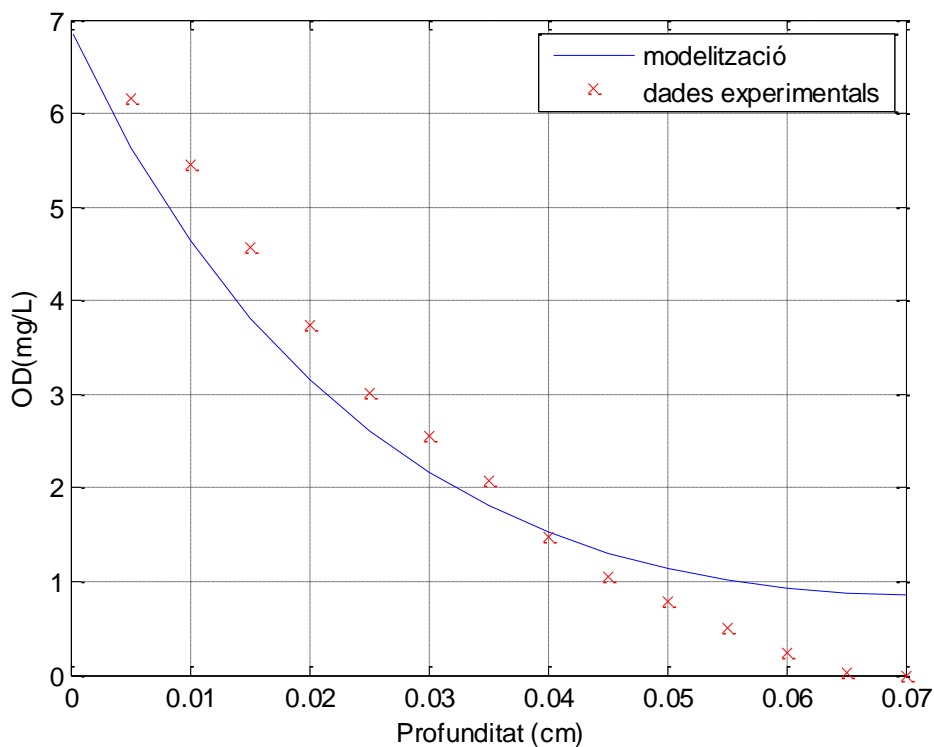


Figura 37. Modelització mitjançant el programa Matlab realitzant simulacions de l'activitat metabòlica a partir de les dades experimentals de cada secció en el bioreactor, la secció que és mostra és la 4.

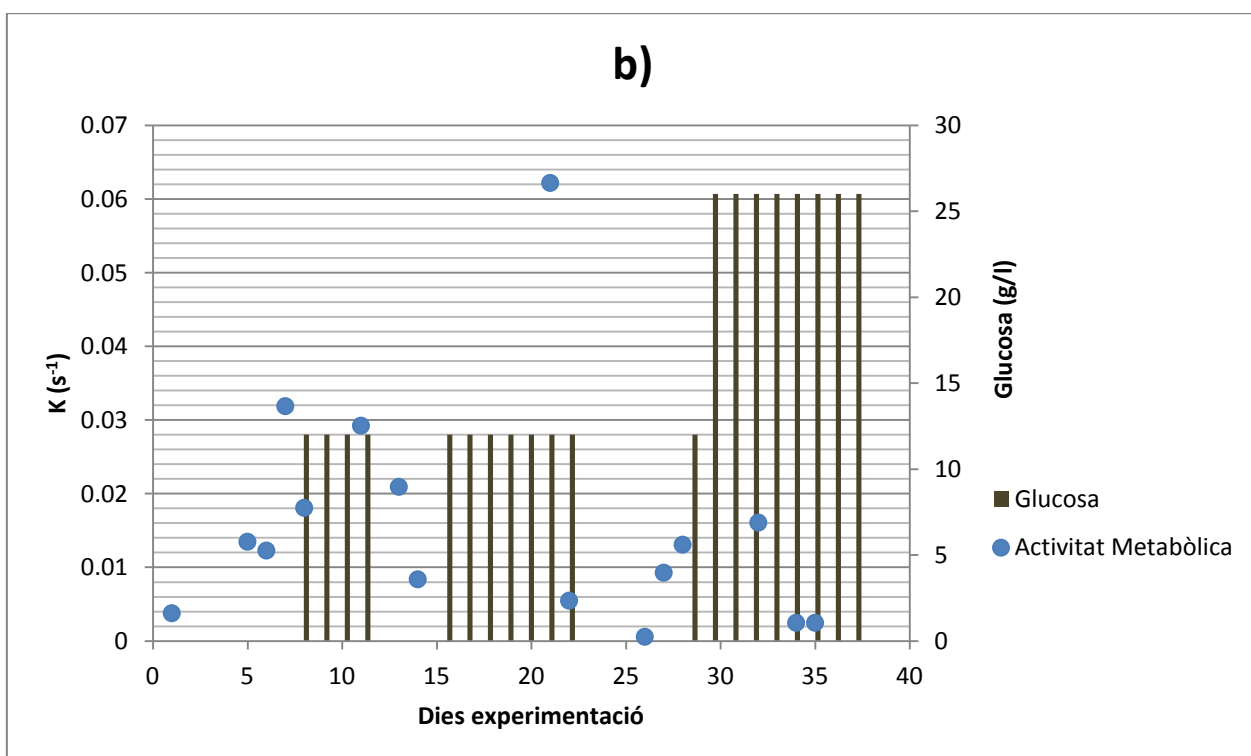
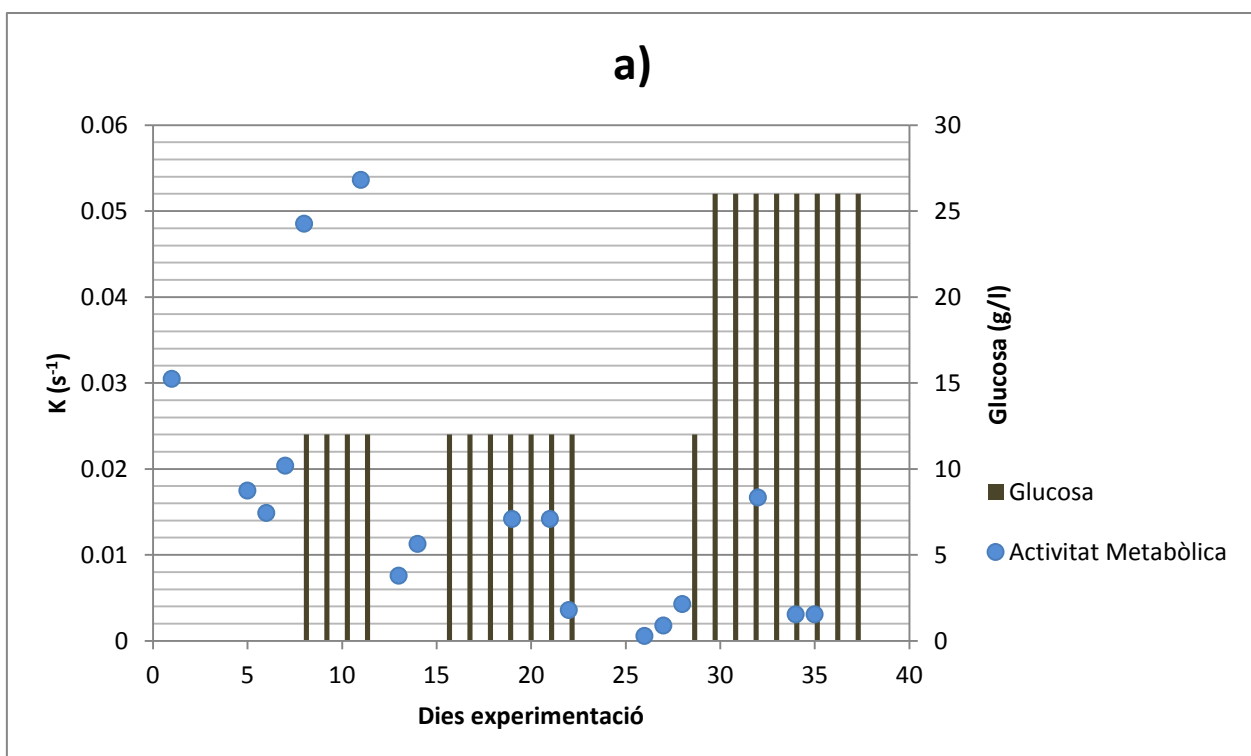
Com es pot observar en la gràfica anterior els punts en vermell determinen els valors reportats experimentalment, i en canvi la línia blava el que ens mostra és la simulació del model segons la fórmula descrita. L'objectiu real de la modelització és intentar aproximar el valor de l'activitat metabòlica al màxim a partir de les dades experimentals. Si valorem les diferents seccions veiem que hi ha variacions en elles, la que més s'aproxima al model és la secció de la Figura 37, com s'observa la tendència

que segueixen les dades experimentals són pràcticament les obtingudes en el modelatge. En canvi les seccions restants no s'aproximen tant, però mantenen una tendència raonable. En realitzar el modelatge de tots els experiments s'ha pogut observar que en alguns casos el model i les dades experimentals no segueixen la mateixa tendència. La variabilitat de la biopel·lícula pot provocar que en un punt en concret no s'adeqüi a la tendència com els altres. Independentment de si segueixen o no la tendència, el model a part d'oferir-nos la possibilitat de graficar-les dades experimentals ens facilita l'obtenció de l'activitat metabòlica del sistema en la secció estudiada.

5.1.2 Estudi de la dinàmica de la biopel·lícula

5.1.2.1 Activitat de la biopel·lícula

En el present apartat el que volem estudiar és el comportament dinàmic de la biopel·lícula en quant a la seva activitat metabòlica. Per això necessitem les dades obtingudes de la modelització explicada anteriorment. Per dur-lo a terme realitzarem una taula en la que es posin en comú les quatre seccions estudiades durant els diferents 35 dies d'experimentació amb les dades obtingudes de l'activitat metabòlica gràcies al model i diferenciant també la concentració de substrat que es subministrava durant aquest període. Aquesta Taula 6 es troba en l'Apèndix 4: Taules per a la caracterització del sistema, on està tabulada l'activitat metabòlica del sistema en estudi segons la secció i el dia d'experimentació que es va realitzar la presa de dades. Les dades obtingudes les grafiquem de forma que quedi la activitat metabòlica amb la glucosa que s'estava subministrant en els dos eixos d'ordenades i els dies d'experimentació en l'eix d'abscisses:



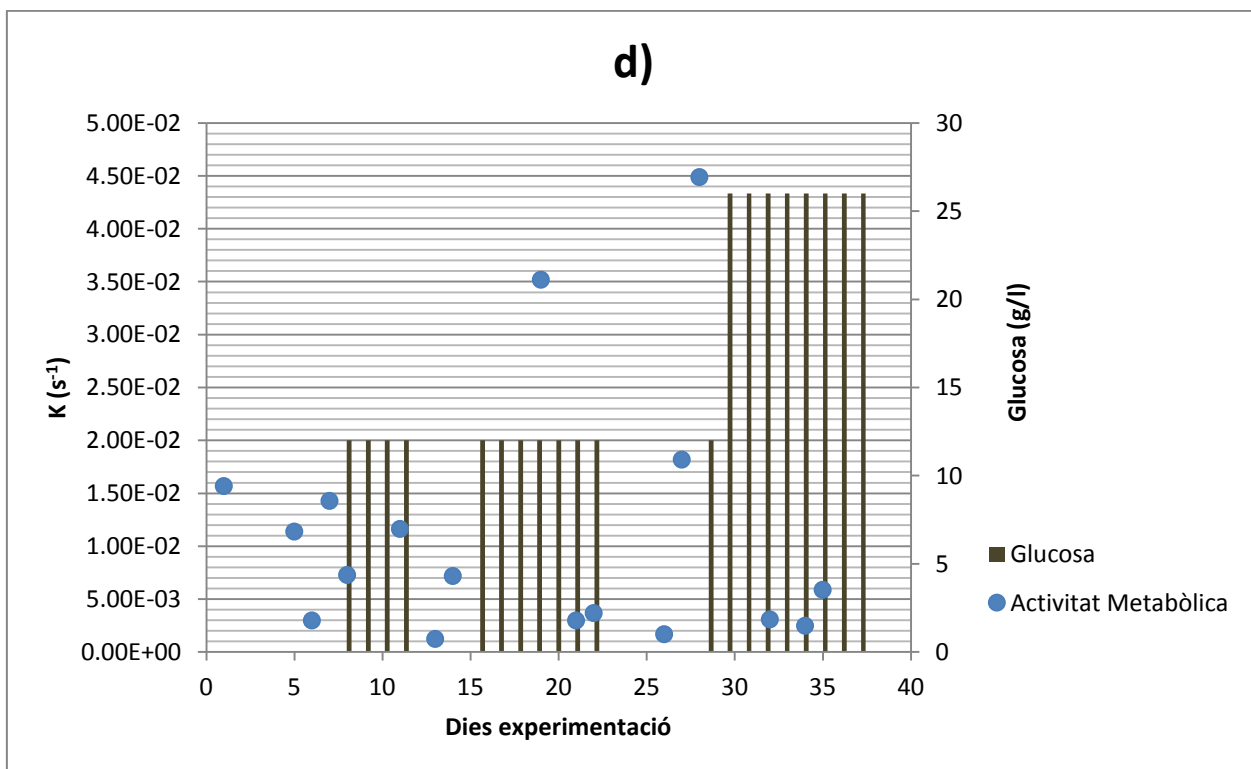
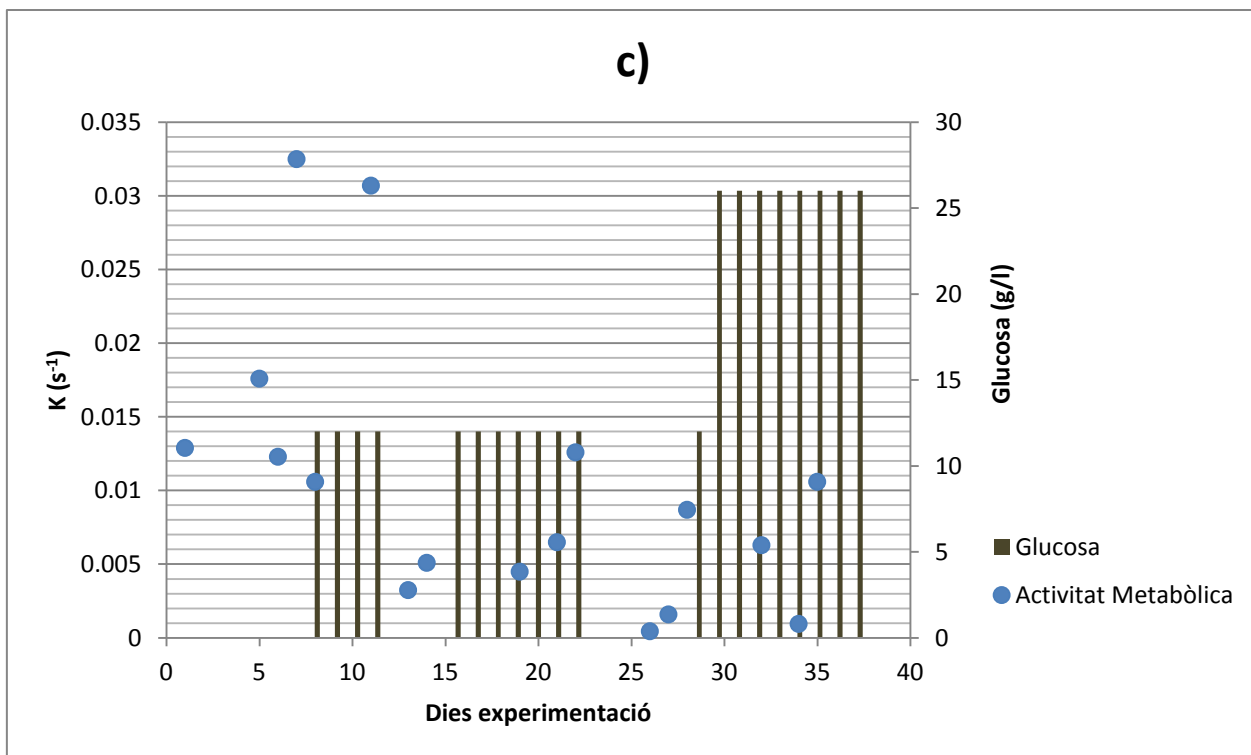


Figura 38. Determinació de l'activitat metabòlica del sistema segons el substrat subministrat i els dies d'experimentació. En aquest gràfic es mostren les diferents seccions diferenciades en el reactor de la següent forma, la secció 1 és representada per la Figura 38. a), la secció 2 per la Figura 38. b), la secció 3 per la Figura 38. c) i finalment la secció 4 per la Figura 38. d).

En la Figura 38 s'observen les diferents seccions que es van delimitar en el bioreactor, en les quals es van realitzar el monitoratge de l'oxigen dissolt amb els microsensores Clark per determinar si hi havia alguna correlació de l'activitat metabòlica amb la quantitat de substrat subministrat. El substrat ha estat inoculat contínuament per les concentracions determinades en els gràfics durant els períodes no endògens. Els gràfics que es visualitzen en aquesta Figura 38, no deixen clar que hi hagi tendències amb la relació del substrat amb la activitat metabòlica. Si observem les seccions per separat per exemple en la secció 1, si que es veu que amb la biopel·lícula en condicions endògenes l'activitat metabòlica és inferior que quan se li canvia el substrat i se li afegeixen 12 g/l de glucosa, quan aquesta torna a les condicions endògenes l'activitat baixa, però seguidament es torna a introduir glucosa de 12 g/l i després de 26 g/l i l'activitat metabòlica en comptes de pujar que seria el comportament esperat, baixa.

En la secció 2 s'observa un comportament bastant semblant al de la secció 1, fent que l'activitat metabòlica quan les concentracions de substrat són 0 al principi estan més baixes que quan se li afegeixen 12 g/l de glucosa, amb un únic pic de l'activitat que es pot descartar, amb la mateixa tendència a baixar l'activitat quan en el final del monitoratge se li inoculen 12 g/l i 26 g/l de glucosa. Una possible explicació a aquests fenòmens podria ser que al introduir la glucosa, com es d'esperar l'activitat metabòlica augmenta com passa en el primer cas, però en cas contrari, al inocular glucosa al final l'efecte és just l'oposat, una causa podria ser la degradació de la biopel·lícula, provocant una disminució de l'activitat metabòlica.

Les seccions 3 i 4 són molt irregulars i no tenen una tendència a seguir ja que els punts més alts de les dues es troben quan la biopel·lícula té condicions endògenes. En la secció 3 a partir del dia 12 l'activitat metabòlica creix quan hi ha substrat i disminueix quan en deixa d'haver-hi, fins a arribar al dia 30 que és quan es torna a afegir glucosa de 12 i 26 g/l. Però, en canvi, la secció 4 és tan irregular que no té cap període de temps que segueixi una tendència determinada. Una possible explicació al comportament de aquestes dues seccions, pot ser per la dificultat de difusió del substrat. Observant aquestes dos seccions en quant a profunditat de biopel·lícula, són les que més rang tenen, això vol dir també que tant l'oxigen com el substrat han d'arribar a més profunditat que no pas en les altres dos seccions provocant aquestes variacions en l'activitat metabòlica. Una altra possible explicació a aquest fet pot ser provocat per a la quantitat de substrat que es va afegir fent que hi hagi substrat en períodes endògens provocant irregularitats en el sistema.

Com a conclusió de realitzar d'aquesta experimentació podem dir que quan el substrat augmenta, també ho fa l'activitat metabòlica. Aquesta conclusió es extreta a partir de la observació dels gràfics de la Figura 38, en els que hi havia períodes que si que complien aquesta tendència, però d'altres que els seus valors eren arbitraris. Una observació que es pot fer és que els valors arbitraris es situen més cap al final dels dies de haver realitzat les experimentacions, això vol dir que potser la biopel·lícula ja no estava en les condicions òptimes com per ser estudiada degut al deteriorament progressiu a mesura que passaven els dies d'aquesta.

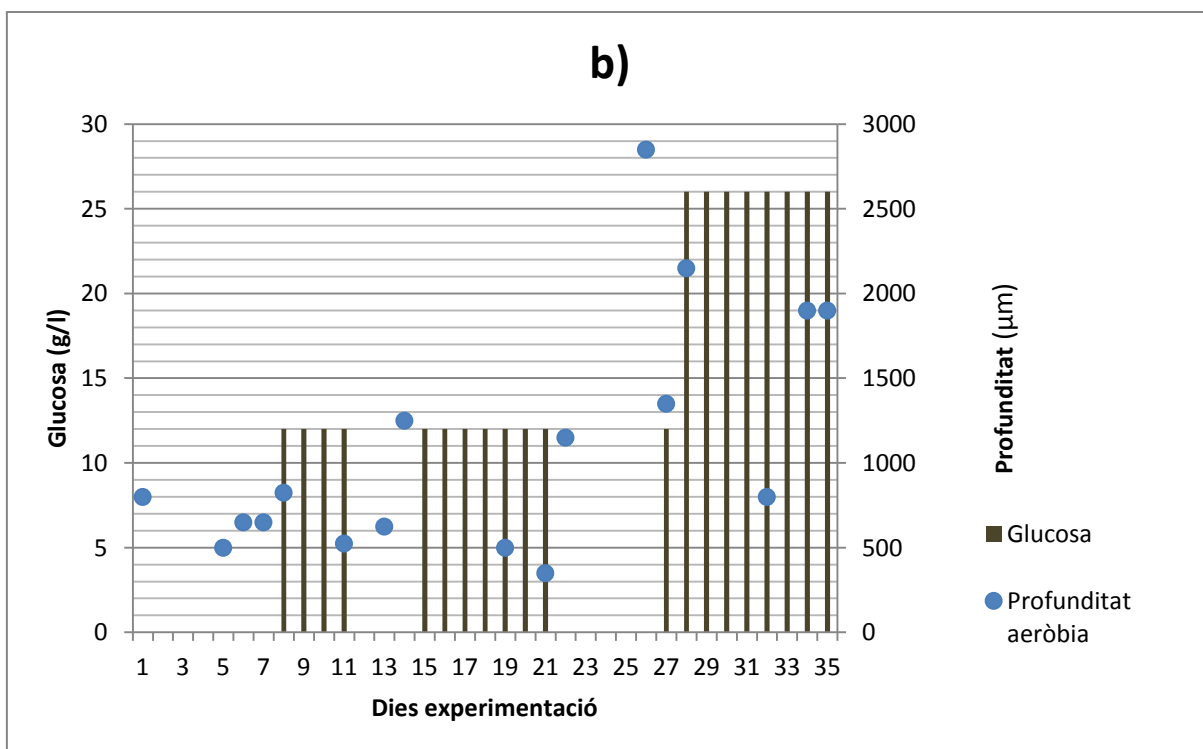
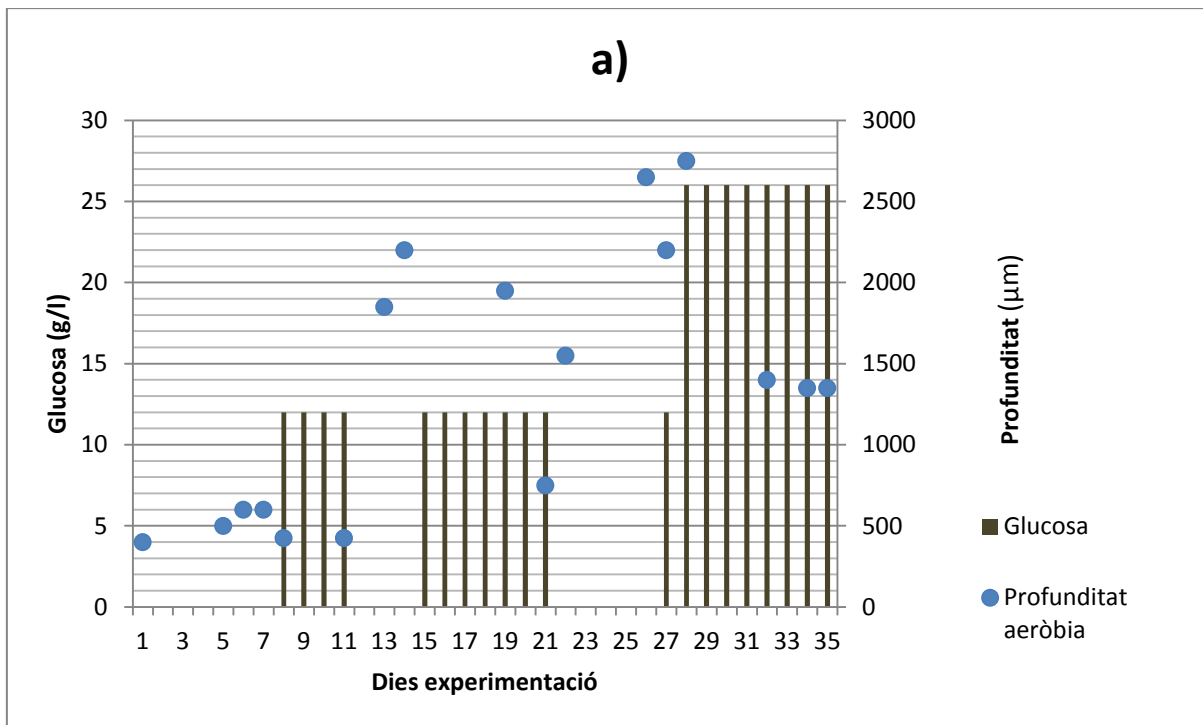
Un altre aspecte rellevant és que les seccions 1 i 2, descartant el punt que sobresurt de la secció 2, segueixen una tendència que descriu el comportament més correcte tenint en compte les limitacions del sistema, i en canvi en les seccions 3 i 4 el comportament com hem dit anteriorment és més irregular. Aquesta irregularitat de les seccions 3 i 4 pot ser per la situació que tenen en el bioreactor, les seccions 1 i 2 és troben al principi del bioreactor i obtenen el substrat més fresc que les seccions 3 i 4. Això ha pogut provocar un deteriorament en aquestes dues seccions, sobretot en la secció 4 que es veu reflectit en els gràfics anteriors de la Figura 38.

5.1.2.2 Gruix aeròbic de la biopel·lícula

Una altre part a valorar de l'evolució de la biopel·lícula és la variació de la profunditat aeròbia segons l'alimentació de substrat al que estigui sotmès. La profunditat aeròbia la podríem definir com a la profunditat des que el microsesnor arriba a la biopel·lícula fins que ens trobem en condicions anòxiques. El que esperem veure en aquests gràfics es que amb la introducció de substrat, la profunditat aeròbia disminueix ja que els microorganismes utilitzaran l'oxigen per alimentar-se, i que quan el sistema estigui en condicions endògenes, la tendència sigui a augmentar la profunditat aeròbia ja que no hi ha consum de substrat.

Per determinar el gruix aeròbic de la biopel·lícula estudiada al llarg dels 35 dies d'experimentació, el que fem és agafar les profunditats que es van obtenir en els perfils de l'apartat 5.1.1.2, ja que és on la biopel·lícula realitza les seves operacions. I l'objectiu d'això es comparar aquesta profunditat amb el substrat subministrat al llarg dels dies. A l'igual que en l'apartat anterior realitzem una taula on s'englobin tots els valors, que la podem trobar a l'Apèndix 4: Taules per a la caracterització del sistema, com a Taula 7.

A continuació, per poder visualitzar els valors de l'anterior taula, els graficarem de forma que en l'eix d'ordenades hi siguin els valors de glucosa i la profunditat aeròbia i en l'eix d'abscisses els dies d'experimentació. Això es farà per les 4 seccions diferenciades del bioreactor:



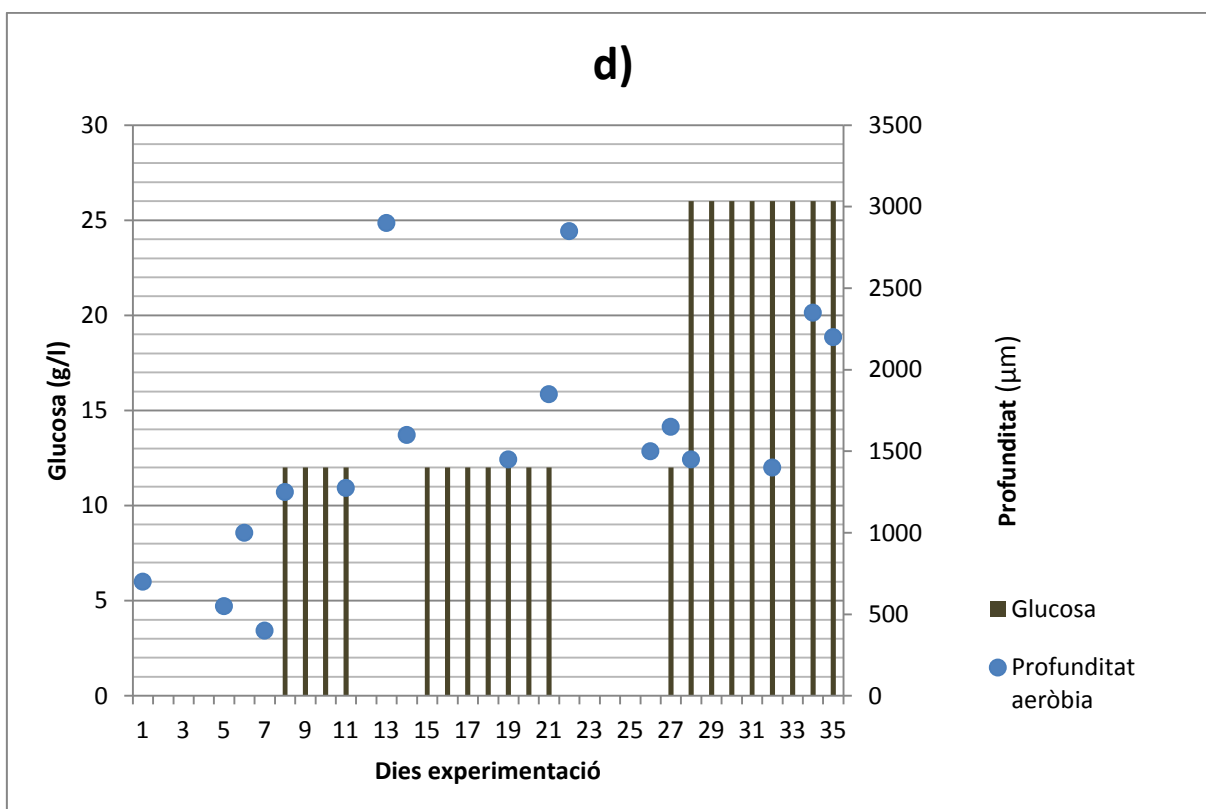
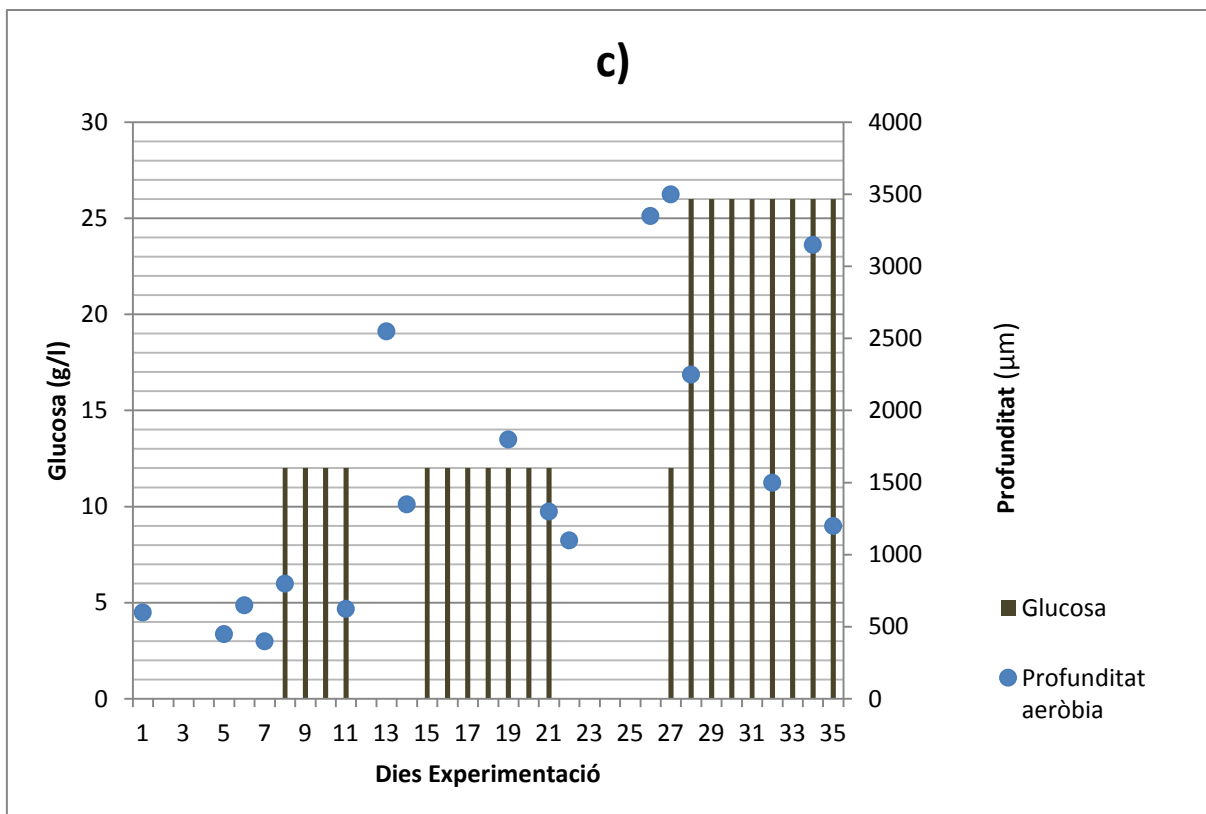


Figura 39. Determinació de la profunditat aeròbia per seccions segons el substrat i els dies d'experimentació. En aquest gràfic es mostren les diferents seccions diferenciades en el reactor de la següent forma, la secció 1 és representada per la Figura 39. a), la secció 2 per la Figura 39. b), la secció 3 per la Figura 39. c) i finalment la secció 4 per la Figura 39. d).

La primera observació general a destacar de la Figura 39, es que en les seccions 3 i 4 el rang de profunditat actiu és més elevat que en les primeres seccions. Aquest rang oscil·la entre 0 – 3500 μm i en canvi el de les seccions 1 i 2 oscil·la entre 0 – 2850 μm . L'explicació a aquesta diferència de rangs pot ser degut a què la biomassa es vagi acumulant al final del reactor i que per tant hi hagi més quantitat de biopel·lícula o bé, perquè en les dos primeres seccions el substrat arriba primer. Al estar al principi del reactor tenen condicions més favorables que les seccions 3 i 4 que estan al final d'aquest i el substrat arriba més tard, provocant un deteriorament i així que part de la biopel·lícula no funcioni correctament i que per tant no consumeixi oxigen, deixant-lo difondre's a més profunditat.

Si continuem observant a gran escala totes les seccions tenen una tendència a augmentar a mesura que passen els dies d'experimentació, encara que hi ha punts que trenquen aquesta inclinació a augmentar, podem dir que amb el temps la biopel·lícula augmenta amb l'augment també de la seva biopel·lícula aeròbica. Aquest comportament és el que caldria esperar perquè a tractar-se d'un sistema viu en continu creixement, és normal que la biopel·lícula augmenti.

Si ens posem a analitzar cada secció independentment de les altres, començant per a la primera, podem observar que en aquest cas, la profunditat activa es manté estable, amb poca inclinació a mesura que passen els dies, en un marge aproximat de 500 μm , aquest varia en la segona fase endògena que sofreix la biopel·lícula augmentant molt la seva profunditat aeròbia de la biopel·lícula, aquesta es mantindrà en valors alts fins arribar al dia 29 que és quan se li està afegint 26 g/l de glucosa i la seva profunditat aeròbia disminueix. Per consegüent la secció 2 té un comportament semblant al principi de l'experimentació mantenint-se estable a uns 700 μm de mitja entre els primers dies, fins a arribar a la segona fase endògena que fa augmentar la seva profunditat aeròbia, però al començar a introduir glucosa com a substrat es dibuixa un descens en el gràfic. Al tornar a la fase endògena torna a pujar la profunditat aeròbia de la biopel·lícula, i al tornar a inocular glucosa hi ha un desnivell amb una estabilitat final. Estudiant la tercera secció veiem que passa el mateix que en les dos primeres, la profunditat aeròbia es manté estable fins arribar a la segona fase endògena que fa augmentar la profunditat aeròbia, al introduir substrat, la profunditat aeròbia disminueix, al arribar a la tercera fase endògena aquesta torna a augmentar i finalment quan s'introdueixen els 26 g/l de glucosa es manté a una profunditat aeròbia bastant alta i irregular comparant-la amb la del principi. El comportament final de la secció 3 segurament és degut a la degradació de la biopel·lícula, ja que hi ha més substrat i per

consegüent, hi hauria d'haver menys oxigen dissolt al llarg de la biopel·lícula. Tanmateix, la secció 4 no es comporta igual que les altres, sinó que al principi té un comportament irregular, que s'estabilitza quan es comença a afegir 12 g/l de glucosa fins al final amb l'excepció de 4 punts on dos d'ells estan situats en la segona i la tercera fase endògena i els altres dos punts que no segueixen la tendència dels altres es troben just al final quan s'introdueixen els 26 g/l de glucosa en els dies 33 i 35, on es pot aplicar la mateixa explicació de la degradació de la biopel·lícula de la secció 3.

Una de les conclusions d'observar els gràfics de la Figura 39, és que al principi de l'experimentació la biopel·lícula es troba en una fase estable del procés i la seva profunditat no varia en grans proporcions al canviar de condicions endògenes, a afegir 12 g/l de glucosa com a substrat. Però en canvi quan es torna a les condicions endògenes per segona vegada, la profunditat aeròbia augmenta i això vol dir que els microorganismes que formen la biopel·lícula no consumeixen tant oxigen i es difon per a la biopel·lícula, fent que la profunditat a la que aquestes molècules arribin sigui major. Per això quan es torna a introduir substrat, la predisposició del sistema és a baixar la profunditat aeròbia. Aquest comportament es pot tornar a veure quan es torna per tercer cop a condicions endògenes, on es veu un augment en la majoria dels casos. I per finalitzar en la última fase on s'inoculen 26 g/l de glucosa tendeix a disminuir.

Per tant, podem dir que quan hi ha substrat els microorganismes que formen la biopel·lícula del nostre sistema, consumeixen l'oxigen per menjar i digerir aquest substrat i quan es troba en condicions endògenes, com que no consumeixen substrat no necessiten tant oxigen i es difon més quantitat de molècules al llarg de la biopel·lícula.

5.1.2.3 Gruix total de la biopel·lícula

En aquesta part de la investigació ens proposem a estudiar l'evolució del gruix de la biopel·lícula en relació a la carrega de substrat i amb el pas dels dies en l'experimentació. El procediment, com s'ha comentat anteriorment, es va fer amb el sensor DUMMY, des que entra en contacte amb el líquid fins que arriba al fons del reactor. Amb aquesta profunditat total i gràcies als perfils que hem detallat segons els estudis de W, Horn, Hempel (2002), on es delimiten la fase líquida, la interfase i la biopel·lícula, podem determinar quin és el gruix total de la biopel·lícula, si a la profunditat determinada pel sensor DUMMY li restem la fase líquida dels perfils realitzats.

Al realitzar aquesta operació obtenim el gruix total de biopel·lícula, que està compost per biopel·lícula aeròbia i per biopel·lícula anaeròbia. El que farem serà tabular els valors de forma que tinguem la profunditat total del biofilm junt amb els dies d'experimentació i la càrrega de substrat subministrada, aquesta taula la trobarem en l'Apèndix 4: Taules per a la caracterització del sistema com a Taula 8. A continuació, per poder visualitzar els valors de l'anterior taula els grafiquem de forma que en l'eix d'ordenades hi siguin els valors de glucosa i la profunditat total i en l'eix d'abscisses els dies d'experimentació. Això es farà per les 4 seccions diferenciades del bioreactor que es podran veure a l'apèndix, a continuació es mostrarà el gràfic de la primera secció.

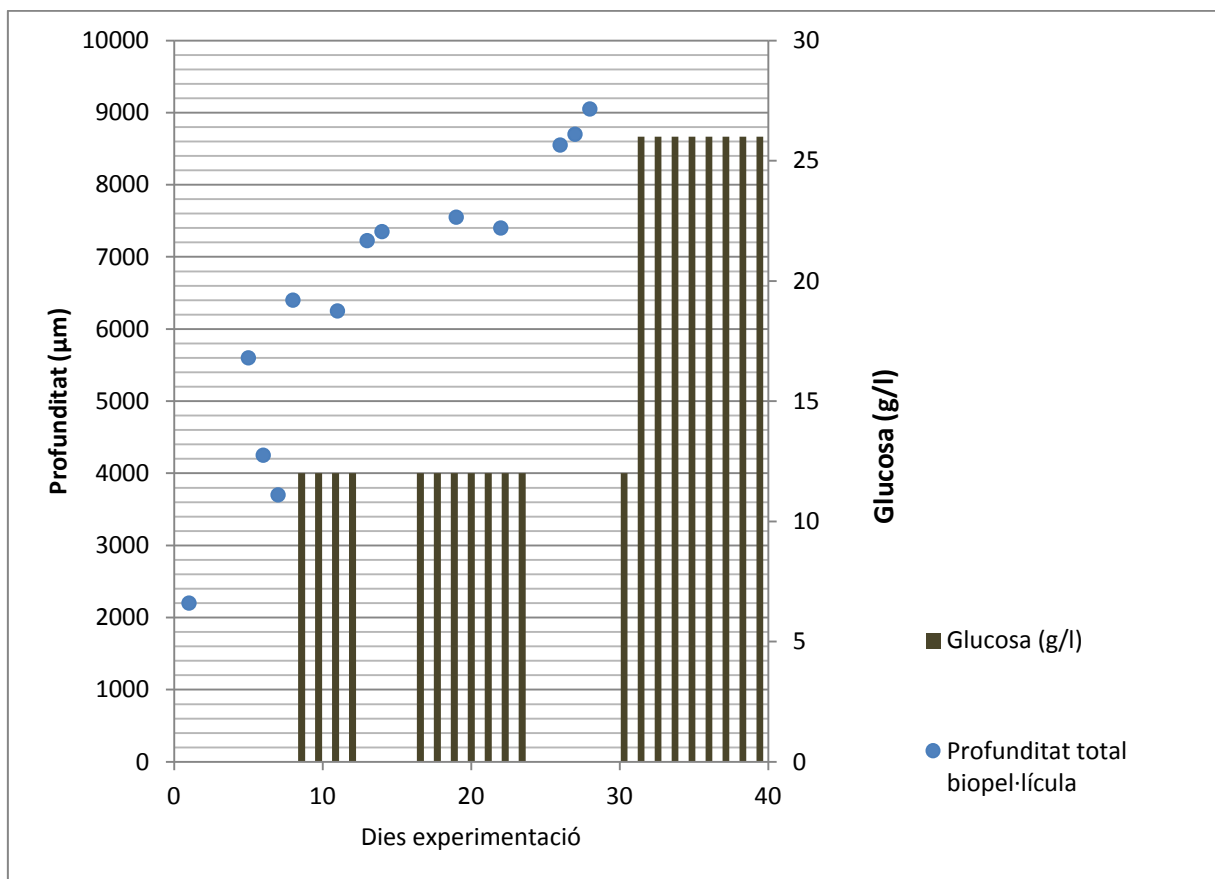


Figura 40. Determinació de la profunditat total de la biopel·lícula per seccions segons el substrat i els dies d'experimentació. En el gràfic es pot observar la profunditat total de la biopel·lícula de la primera secció.

Estudiant les seccions anteriors es pot veure que la tendència de la biopel·lícula a créixer a mesura que passen els dies d'experimentació, al igual que en la Figura 40. Aquest creixement, com es pot observar a la gràfica, no depèn en grans trets del substrat que se li subministra, però si ens fixem en la primera càrrega de glucosa, la biopel·lícula creix considerablement en tots els perfils. El que pot succeir és que, com s'ha comentat anteriorment, en la discussió de la profunditat aeròbia, no tota la

glucosa que s'ha inoculat s'ha consumit, de tal manera que encara hi queda en els períodes endògens fent que aquest creixement sigui major, ja que el que esperem veure es que quan s'alimenta la biopel·lícula aquesta creix més.

Seguidament, com que sabem la profunditat total i l'aeròbica, el que hem decidit estudiar és el percentatge de profunditat aeròbica en l'evolució seguida en els dies d'experimentació. Aquest gràfic s'ha realitzat per a totes les seccions, tenint en compte tots els dies d'experimentació, per veure els altres anar a l'Apèndix 6: Gràfics del percentatge del gruix aeròbic de la biopel·lícula. A continuació per poder visualitzar els valors grafiquem de forma que en l'eix d'ordenades hi siguin els valors de glucosa i el % de profunditat aeròbia i en l'eix d'abscisses els dies d'experimentació.

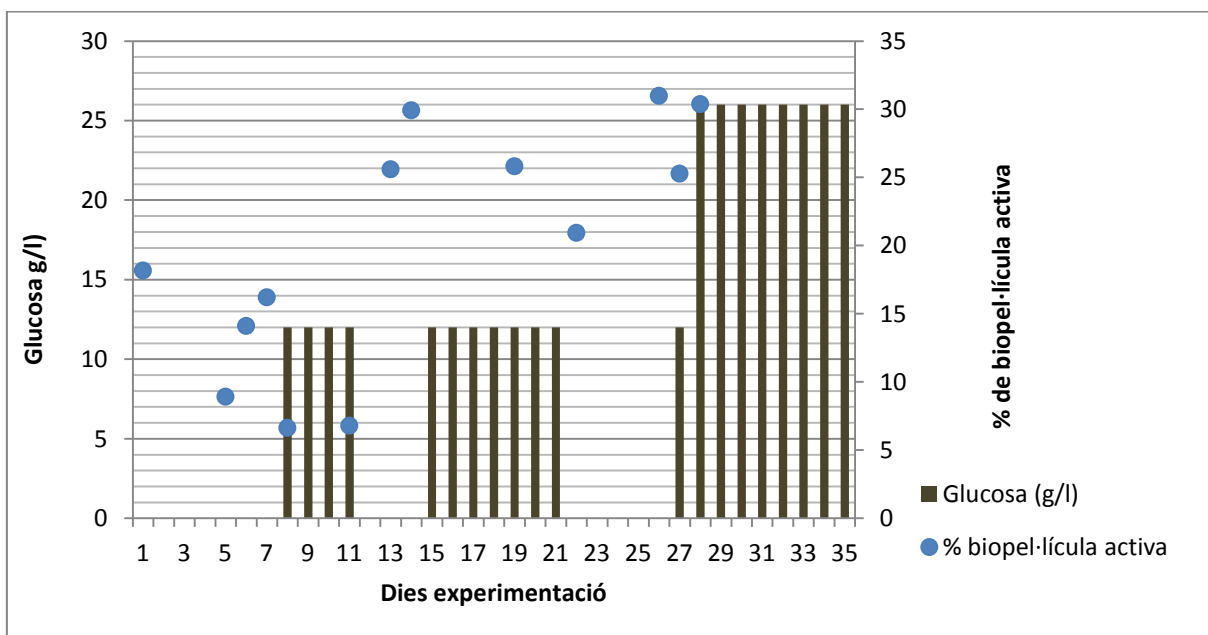


Figura 41. Gràfic que ens mostra el % de biopel·lícula aeròbia durant tot el període d'experimentació tenint en compte la càrrega de substrat. Aquesta figura pertany a la secció 1, l'entrada del reactor.

En la figura podem veure que els percentatges no són molt alts, a l'igual que en les altres seccions. El comportament de la biopel·lícula, com es pot observar, segueix la mateixa tendència que es va descriure en l'apartat 5.1.2.2, que determinava que la biopel·lícula tenia un comportament estable durant el primer període endogen. Però al subministrar substrat la profunditat aeròbia disminuïa ja que aquest oxigen dissolt era consumit, i al tornar al període endogen aquestes molècules d'oxigen deixaven de ser consumides i podien difondre's a través dels porus de les biopel·lícules arribant a més profunditat. Aquest comportament es pot observar en la secció 1, Figura 41, i en les altres seccions que es poden veure en l'apèndix 6.

5.1.3 Estudi de la influència de cabals a la biopel·lícula

Per una millor caracterització de les biopel·lícules, es va voler estudiar la dinàmica del sistema al canviar el cabal que arriba al reactor. L'objectiu d'aquesta part del treball és poder determinar la dinàmica que té el sistema quan es varia el cabal amb la mesura de l'oxigen dissolt de les biopel·lícules. Per fer-ho utilitzarem els passos descrits en monitoratge de perfils mitjançant els Clarks. A més a més, per intentar entendre la relació que hi ha entre les biopel·lícules i condicions del medi, variarem l'alimentació, fent experiments en estat endogen i amb càrrega de substrat. Gràcies als microsensors podrem saber a quina profunditat es deixa de difondre l'oxigen en la biopel·lícula.

A l'hora de realitzar l'experimentació, tant en condicions endògenes com amb substrat, el que es va realitzar va ser, un perfil per a cada canvi de velocitat. Per a cada canvi de velocitat es va esperar a que el sistema s'estabilitzés per tornar a realitzar un perfil amb el micosensor Clark. Es van realitzar perfils per a tots dos medis a les següents velocitats: 1, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20 rpm.

A continuació, graficarem dos experimentacions realitzades fent variacions en la velocitat de circulació del medi a través de la bomba, on aquest medi es trobava en condicions endògenes en el primer cas i amb càrrega de substrat (1 g/l de glucosa) en la segona experimentació. Com es pot observar, les rpm de la bomba les trobem en l'eix d'abscisses i la profunditat en la que hi deixa de haver-hi oxigen en l'eix d'ordenades.

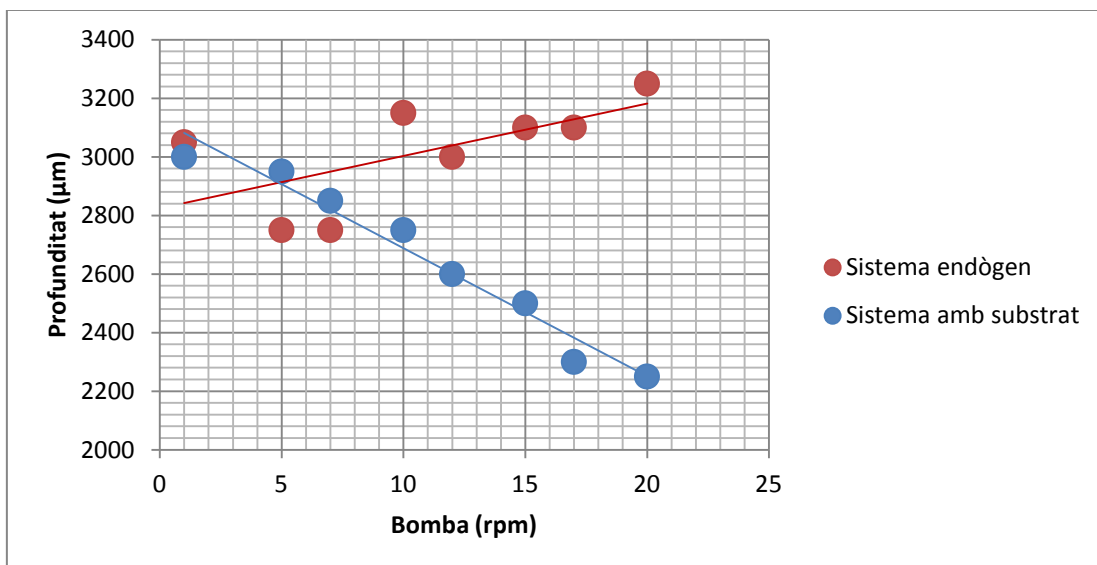


Figura 42. Gràfic on s'estudia la dinàmica del sistema en fer variacions en la velocitat de circulació en dos casos; en condicions endògenes i quan hi ha substrat.

Observant la Figura 46, podem dir que hi ha diferències ressenyables quant a la relació del medi, la velocitat i la biopel·lícula. Si ens centrem en el cas del sistema endogen, podem veure que quan la velocitat de circulació va augmentant, també ho fa la profunditat en la que l'oxigen es difon per la biopel·lícula. En canvi, quan tenim el sistema amb càrrega de substrat, passa totalment el contrari, la tendència que té el sistema és que a mesura que augmenta la velocitat de circulació, disminueix la difusió del oxigen i per això la profunditat cada vegada és menor.

Podríem afirmar veient el comportament del sistema de la Figura 46, que quan la biopel·lícula es troba en condicions endògenes, i s'augmenta la velocitat, això fa que l'oxigen que hi ha es difongui amb més facilitat per la biopel·lícula fent que la profunditat sigui major, per tant, una major fluïdesa del medi endogen ajuda a que la transferència de les molècules d'oxigen sigui a més profunditat. Tanmateix, quan la biopel·lícula la tenim amb càrrega de substrat, el que succeeix és que al augmentar la velocitat, igual que en el cas anterior augmenta la difusió i transferència de l'oxigen al llarg de la biopel·lícula. Tot i així, també ho fa el substrat, per consegüent, la biopel·lícula per consumir el substrat necessita l'oxigen i per aquest motiu la profunditat aeròbia va baixant a mesura que augmenta la velocitat.

Com s'ha pogut comprovar, amb els microsensores Clark es poden estudiar perfectament les biopel·lícules, perquè ens donen una resposta al instant de les condicions en la que es troba el punt observat, però tot i així ens creen limitacions, al no poder estudiar la dinàmica de forma constant durant un període de temps i en diferents punts. Per causa d'aquest motiu hem d'introduir el microsensor Clark de forma instantània en un punt de la biopel·lícula està molt bé per realitzar perfils instantanis i per saber les característiques del sistema en aquest moment, però no donen una solució per al comportament dinàmic de la biopel·lícula. Per tant, el que es vol fer a continuació és trobar una solució a les limitacions que ens marquen els Clark quant a l'estudi dinàmic amb la utilització dels microsensores MEMS.

5.2 Monitorització de la biopel·lícula amb microsensores MEMS

Com hem dit anteriorment, en aquest apartat del treball el que volem comprovar és si els microsensores MEMS són capaços de suplir les limitacions que presenten els Clark a l'hora d'estudiar la dinàmica del sistema al llarg del temps.

Per tal de comprovar-lo, es van realitzar experimentacions amb els microsensores MEMS al llarg del temps situats en la biopel·lícula, on a partir de variacions en el

sistema, tant de substrat com d'aireació, s'espera veure la resposta dinàmica de la biopel·lícula. D'aquesta manera comprovar si aquests microsensores ens són més útils que els altres per estudiar les biopel·lícules. Per realitzar les experimentacions, com s'explica en el punt 4.4.3.3 vam introduir el microsensor MEMS a una profunditat estratègica, determinada per un perfil previ amb el Clark, on està situada la interfase. A partir d'aquí es van realitzar diferents canvis en el sistema per veure com responia la biopel·lícula mitjançant el microsensor MEMS i si es pot observar una bona dinàmica.

Primerament, es va a passar a la preparació del calibratge dels MEMS per obtenir la recta de calibratge. En aquesta experimentació es van realitzar dos rectes de calibratge, una sense Nafion, i l'altra amb Nafion, amb el microsensor com a elèctrode de referència intern. Recordem que el Nafion és una membrana catòdica que protegeix l'àrea sensible dels elèctrodes perquè no s'acumuli brutícia fent que la mesura sigui estable. Aquesta part experimental es va fer per comparar la sensibilitat al recobrir el sensor amb la membrana de Nafion. En la següent figura es pot observar una gràfica que mostra la recta de calibratge amb i sense Nafion del elèctrode de referència extern, on es pot apreciar una petita diferència de sensibilitat que fa variar una mica la línia de tendència, però a canvi, ens aporta una major estabilitat al realitzar les mesures, ja que aquesta membrana ens ajuda a prevenir les incrustacions en l'àrea sensibles dels diferents elèctrodes, com s'ha comentat abans.

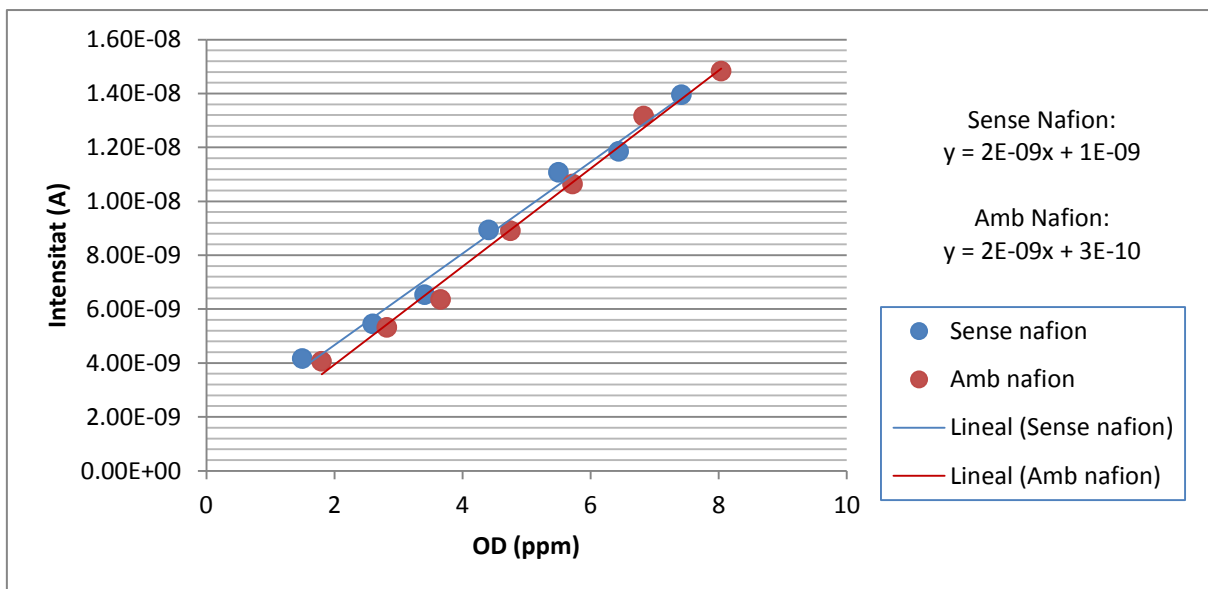


Figura 43. Gràfic on es veuen les dos rectes de calibratge sense Nafion i amb Nafion, que com es pot apreciar al portar el Nafion fa baixar una mica la sensibilitat del microsensor, però ens aporta més estabilitat en el sistema.

Un cop preparat el sistema, s'introdueix el microsensor MEMS en el mateix punt on es va realitzar el perfil amb el Clark i es baixa fins a la interfase. L'experimentació consta de tres fases:

1. Oxigenació i desoxigenació
2. Substrat 1 g/l glucosa
3. Substrat 8 g/l glucosa.

La primera fase d'oxigenació i desoxigenació, es va realitzar per veure l'evolució de l'oxigen amb el temps fent variacions en l'aireació. Amb la desoxigenació esperem que la concentració d'oxigen dissolt disminueix i quan es torni a oxigenar, aquesta concentració augmenti. D'aquesta manera es pot observar si realment aquest microsensor pot detectar canvis en el sistema i si està situat en un bon punt per seguir la dinàmica del sistema.

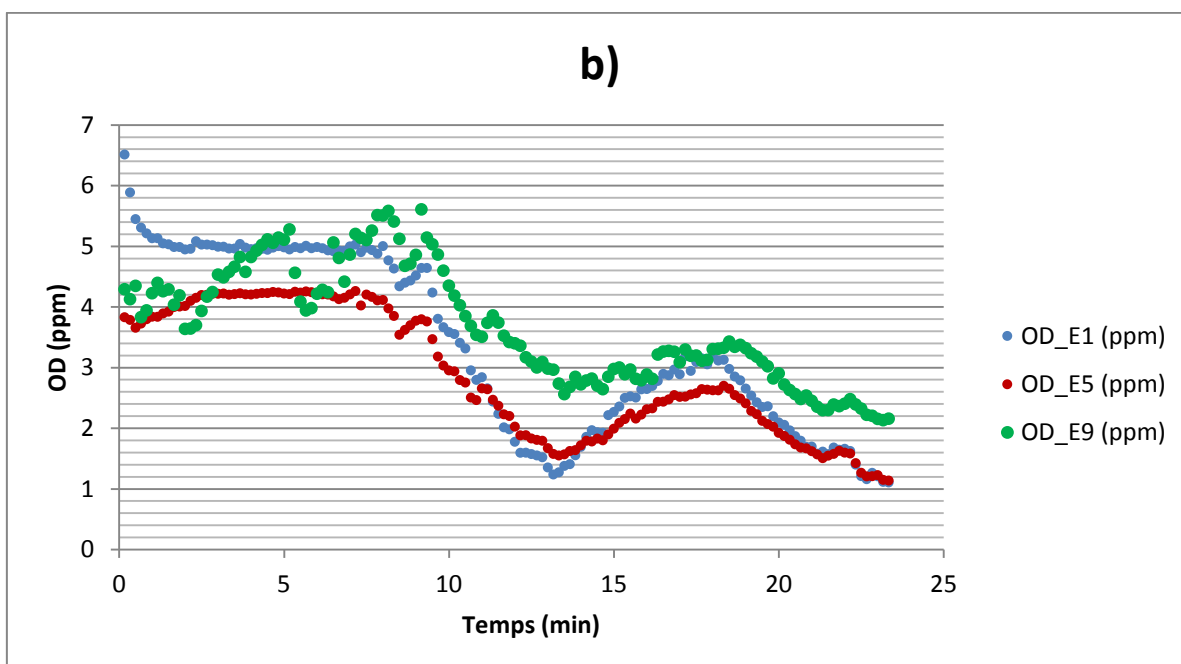
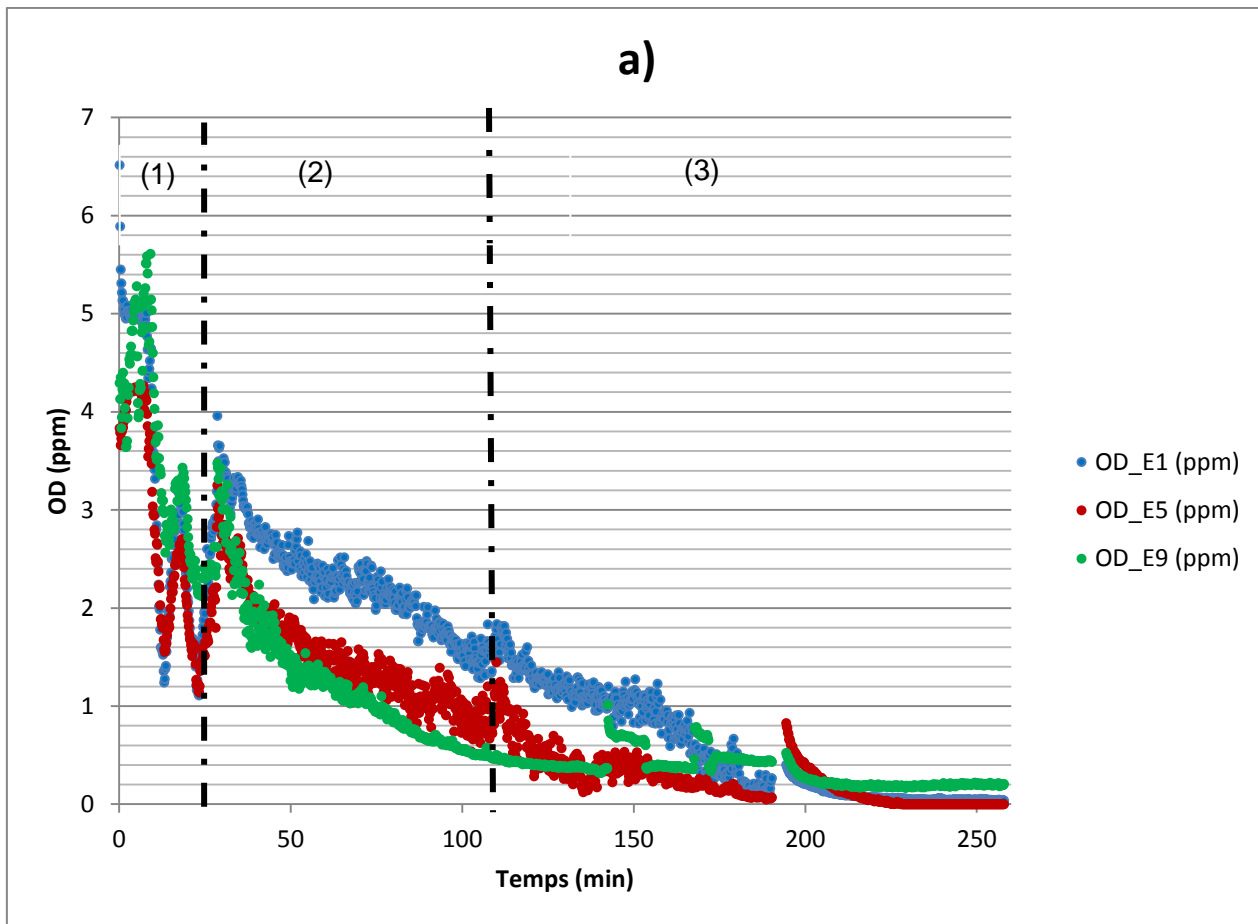
Els períodes d'aireació van ser: Oxigenació (0 – 5 minuts), desoxigenació (5 – 10 minuts), oxigenació (10 – 15 minuts) i desoxigenació (15 – 20 minuts).

Un cop finalitzada la primera fase, deixem que s'estabilitzi el sistema per passar a la segona fase on el microsensor es mantindrà exactament en el mateix lloc, on la única variació serà que la aireació serà contínuament d'oxigen i s'introduirà 1 g/l de glucosa. La segona fase té lloc en el període de temps que va des dels 23 minuts fins als 107 minuts. On esperem veure quina ha estat la resposta del sistema al passar d'un període endogen a una amb càrrega de substrat. El que es confia que passi és que la concentració d'oxigen vagi disminuint perquè al introduir el substrat els microorganismes necessitaran del O_2 per a degradar-lo.

Per finalitzar l'experimentació es va passar a la fase 3 on es va introduir glucosa a concentració de 8 g/l per observar la dinàmica al augmentar la càrrega de substrat, la fase 3 es va fer durant el període de 110 – 254 minuts.

A continuació es pot observar la dinàmica de la biopel·lícula en les tres fases descrites anteriorment. En l'eix d'ordenades tenim l'oxigen dissolt (ppm) i en l'eix d'abscisses tenim el temps d'experimentació (min). Aquesta mesura, s'ha realitzat amb els 8 elèctrodes que formen el microsensor MEMS, de tots aquests s'han seleccionat tres elèctrodes a diferents distàncies per graficar-los, elèctrode 1 a 0 μm , elèctrode 5 a 200 μm i elèctrode 9 a 450 μm . Aquestes distàncies són referents des del primer elèctrode, es a dir que no fan referència a la profunditat en la que s'ha mesurat en la biopel·lícula.

Els diferents elèctrodes del microsensor MEMS són de gran utilitat ja que ens permeten adquirir mostres simultànies en el mateix instant.



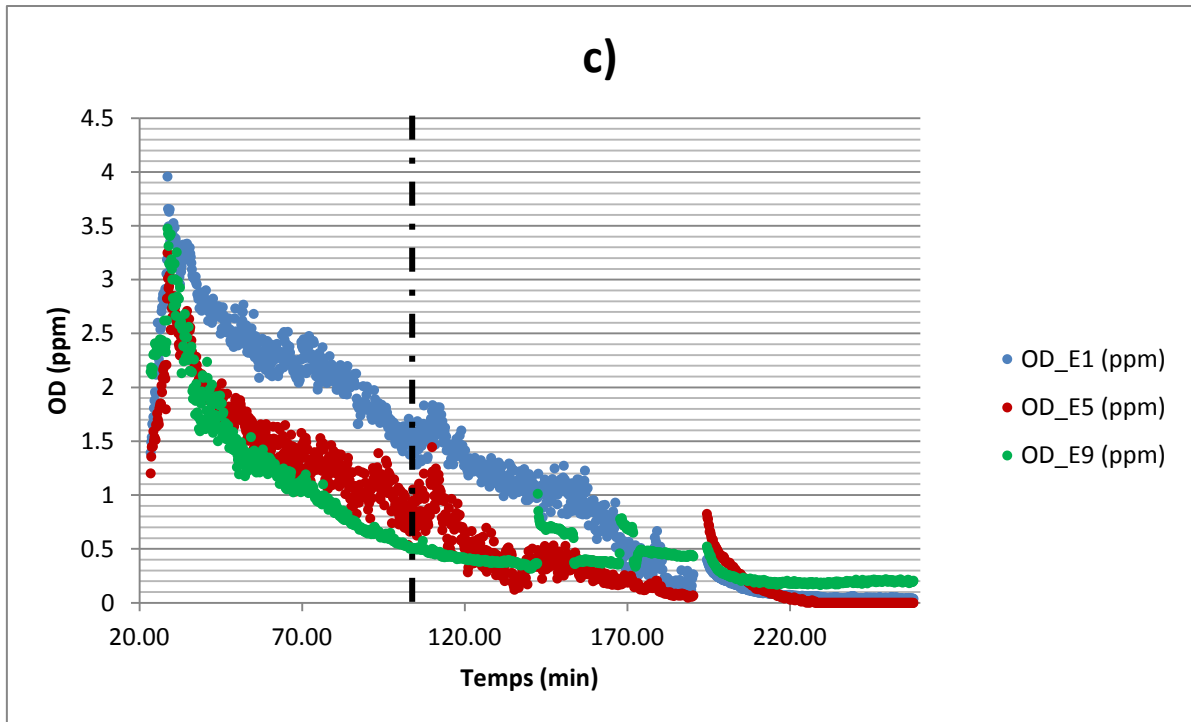


Figura 44. En la figura a) es pot observar la dinàmica de la biopel·lícula al llarg de les 3 fases obtinguda mitjançant els microsensors MEMS, on la primera fase està indicada per (a), la segona fase per a (b) i la tercera, per (c). En el gràfic b) el que s'observa és la resposta del sensor MEMS al realitzar la primera fase de oxigenació i desoxigenació en la biopel·lícula. En el gràfic c) podem veure les dos fases finals del experiment on s'introdueix glucosa per determinar la resposta del sistema, on es poden veure les dos fases separades per la línia central.

En la Figura 44, es pot observar la dinàmica del oxigen dissolt en la biopel·lícula en tres profunditats diferents. S'ha de dir que els resultats obtinguts coincideixen amb el que s'esperava obtenir.

A l'observar el gràfic detalladament podem distingir les 3 fases del procés perfectament. La primera fase que té lloc des del principi on es comença a oxigenar la biopel·lícula es pot apreciar com, sobretot l'elèctrode 5, augmenta amb el pas del temps degut a la primera oxigenació, això passa amb tots els altres elèctrodes que no es mostren en el gràfic. Quan comencem a desoxigenar gràcies al nitrogen, l'efecte que provoca en el sistema és totalment el contrari, fent baixar de forma molt dràstica la concentració d'oxigen dissolt. Passa el mateix en realitzar l'altre oxigenació i desoxigenació, com era d'esperar. Un altre aspecte que podem observar és que la resposta de l'elèctrode que es troba a menys profunditat, és més ràpida a la oxigenació i a la desoxigenació, és a dir, que en la primera desoxigenació es pot veure com els tres elèctrodes detecten que la concentració d'oxigen disminueix, però és el elèctrode amb menys profunditat el que més baixa, i a la vegada el que més puja quan s'oxigena. Això vol dir que a menys profunditat la difusió de les molècules d'oxigen és més senzilla, i en canvi a més profunditat l'efecte és totalment el contrari, per tant, la difusió de les molècules d'oxigen a més profunditat és més difícil.

Al centrar-nos en la segona fase del procés, si observem la que la Figura 44 c) , es pot apreciar que un cop que hem deixat que el sistema s'estabilitzi a partir del minut 23, l'oxigen dissolt comença a disminuir a mesura que passa el temps de forma progressiva. Aquesta tendència es pot veure en tots els elèctrodes que es van utilitzar en la pràctica al igual que els que estan graficats en la figura anterior, amb la coincidència de que els elèctrodes a més baixa profunditat, com l'elèctrode 1, tenen nivells més alts de concentració d'oxigen i els que més profunditat tenen, com és el cas del elèctrode 9, tenen més baixa concentració d'oxigen dissolt. Aquesta disminució és provocada pel subministrament de 1 g/l de glucosa que es comença a fer en la segona fase. El que podem deduir pel comportament que podem veure, és que, encara que s'oxigeni el sistema, amb la introducció del substrat, els microorganismes necessiten el oxigen per poder degradar el substrat que s'està carregant, i a mesura que passa el temps el substrat es va difonent a través de la biopel·lícula fent disminuir la concentració d'oxigen a totes les profunditats.

Al finalitzar la segona fase, hi va haver un període on no es va introduir glucosa, per això s'aprecia un petit increment de la concentració d'oxigen en totes els elèctrodes, no obstant, al començar amb la tercera fase, s'alimenta una càrrega de 8 g/l de glucosa constant, molt superior que la de la segona fase. Tanmateix, no s'observa cap canvi brusc en les concentracions d'oxigen dissolt, si no, que segueixen la mateixa tendència a disminuir fins a apropar-se a valors de 0 ppm. Cal comentar que en la Figura 44, es veu un petit augment de la concentració d'oxigen junt a un període sense dades, això es degut a un problema que es va tenir amb l'ordinador que es va apagar, però de manera eficient es va poder continuar amb l'experimentació.

El que podem deduir de l'experimentació anterior és que els la tendència que segueix l'oxigen dissolt en la biopel·lícula és a disminuir amb la introducció de substrat, ja que es utilitza pels microorganismes per degradar el substrat. Un altre punt a destacar és que la difusió de les molècules dissoltes d'oxigen és més difícil a major profunditat com s'ha vist gràcies a les mesures preses amb els MEMS a diferents distàncies simultàniament. Finalment, per concloure aquesta valoració de l'experiment, podem dir que la dinàmica s'ha pogut observar perfectament gràcies als microsensors MEMS, i per tant que són una eina molt útil a tenir en compte per a l'estudi de les biopel·lícules. Ens permet realitzar mesures a diferents profunditats a l'hora, durant el període de temps que es vulgui determinar, fet que no es podia fer amb els microsensors Clark, per tant aquesta limitació que trobàvem en l'experiment anterior, la podem suplir amb aquests microsensors.

5.3 Estudi cinètic de la biopel·lícula

El propòsit del present apartat és determinar la cinètica dels microorganismes amb els que hem realitzat tota l'experimentació anterior. L'aplicació de la cinètica ens ajudarà a comprendre millor el funcionament de la biopel·lícula perquè ens facilita l'obtenció de paràmetres mitjançant l'ajust d'un model. En tots els models el que volen determinar és la velocitat de creixement dels microorganismes i es basen en l'equació 8 per fer-ho:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad \text{Equació 8}$$

La velocitat específica de creixement (μ), és el que fa variar la teoria cinètica d'un model amb un altre, com s'explica en l'apartat 3.5.3, les dos cinètiques més utilitzades són la de Monod i Tessier. En el nostre treball hem utilitzat la de Monod, ja que és la més utilitzada i la que s'apropa més a la realitat. L'equació que descriu Monod és:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S_i}{K_{sMi} + S_i} \quad \text{Equació 1}$$

On μ és la velocitat específica de creixement bacterià (s^{-1}), μ_{\max} (s^{-1}) és la velocitat màxima de creixement, el paràmetre S_i és la concentració de substrat, K_s és la constant de velocitat mitja (mgOD/L).

Els models comentats anteriorment, incloent el de Monod, estan pensats per l'estudi cinètic de biomassa en suspensió, on els microorganismes tenen més facilitat per distribuir-se per l'espai i més superfície de contacte. En el projecte s'estudia el creixement de la biomassa immobilitzada. Per tant en el nostre sistema experimental no podem utilitzar paràmetres bibliogràfics (Tchobanoglous et al. 2002) que facin referència a microorganismes en suspensió. Els estudis que es realitzen amb biomassa en suspensió no donen tan bons resultats al ser experimentacions totalment diferents i no estar comptabilitzada la resistència al transport de matèria tan bé com els reactors amb la biomassa immobilitzada, fet que causa que els paràmetres estiguin sobredimensionats. El que es vol aconseguir és determinar la biocinètica que té una biopel·lícula en les condicions més habituals, treballant amb el sistema experimental per al cultiu on tindrem la biomassa immobilitzada per simular de la millor manera el nostre sistema al real.

Tanmateix, s'han fet adaptacions de models cinètics en suspensió per poder estudiar la cinètica en sistemes amb la biomassa immobilitzada. El model de Monod que és la

cinètica que utilitzarem ha estat contrastat per molts estudis, (Mudliar et al. 2008), per treballar en sistemes on la biomassa es troba immobilitzada. En el nostre cas, tenint en compte que tenim dos substrats (oxigen i glucosa), adaptem el model de Monod per que estigui limitat pels dos substrats com es mostra en la següent equació:

$$\mu = \mu_1 \cdot \mu_2 \quad \text{Equació 9}$$

Per tant, modificarem l'equació de Monod variant la velocitat de creixement dels microorganismes per la equació 9. De forma que queda:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_{s1}}{K_{s1} + C_{s1}} \cdot \frac{C_{s2}}{K_{s2} + C_{s2}} \quad \text{Equació 10}$$

Normalment, per representar la cinètica del sistema estudiat el que es fa és una corba on es mostri la velocitat de consum que varia depenent de la concentració de substrat que se li assigni, una corba de Monod. En el nostre cas, per limitacions dels sistema, només hem pogut treballar amb oxigen i, per aquest motiu aplicarem la corba de consum d'oxigen (OUR) per a l'obtenció dels paràmetres a partir de l'equació següent:

$$OUR = \frac{dO}{dt} = \frac{1}{Y_{X/O}} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/O}} \cdot \frac{C_{s1}}{K_{s1} + C_{s1}} \cdot \frac{C_{s2}}{K_{s2} + C_{s2}} \cdot X + K_d \cdot X \quad \text{Equació 11}$$

Els paràmetres de l'equació 11 es divideixen en dos grups, els que descriuen el consum del substrat 1 (glucosa) i els que descriuen el consum de substrat 2 (oxigen). Per tal de determinar aquests paràmetres cinètics s'haurà d'estudiar l'efecte de la concentració d'oxigen sobre la OUR sense tenir en compte la concentració de glucosa i l'efecte de la concentració de la glucosa sense tenir en compte la concentració d'oxigen.

A continuació s'estudiarà l'efecte de l'OUR en funció de la concentració de glucosa alimentada. Aquest efecte s'estudiarà treballant sense limitació d'oxigen dissolt, d'aquesta manera l'equació 11 queda simplificada:

$$OUR = \frac{\mu_{\max}}{Y_{X/O}} \cdot \frac{C_{s1}}{K_{s1} + C_{s1}} + K_d \cdot X \quad \text{Equació 12}$$

Per determinar K_{s1} , K_d i $q_{o\max}$ ($\mu_{\max} / Y_{X/O}$), es mesurarà el consum d'oxigen dins de la biopel·lícula degut a la biodegradació al seu interior de la glucosa. Aquest consum serà mesurat a diferents concentracions de glucosa amb l'objectiu d'aconseguir una bona corba de consum d'oxigen, per a través d'aquesta determinar els paràmetres cinètics. Per tant per obtenir aquesta corba de consum el que es farà en

l'experimentació serà canviar la concentració de substrat progressivament, de forma que es començarà en condicions endògenes (0 g/l de glucosa) i posteriorment 2, 4, 6, 8, 10, 12, i 14 g/l de glucosa.

El consum d'oxigen a l'interior de la biopel·lícula es va estimar a partir de l'enregistrament de perfils d'oxigen dissolt, seguint els passos que es descriuen en monitoratge de perfils d'oxigen i en el mètode per a la determinació de la biocinètica, com el que es mostra a la Figura 45 amb una concentració de glucosa alimentada de 4 g/l. La resta de perfils, enregistrats a les altres concentracions de glucosa es recullen a l'apèndix 7.

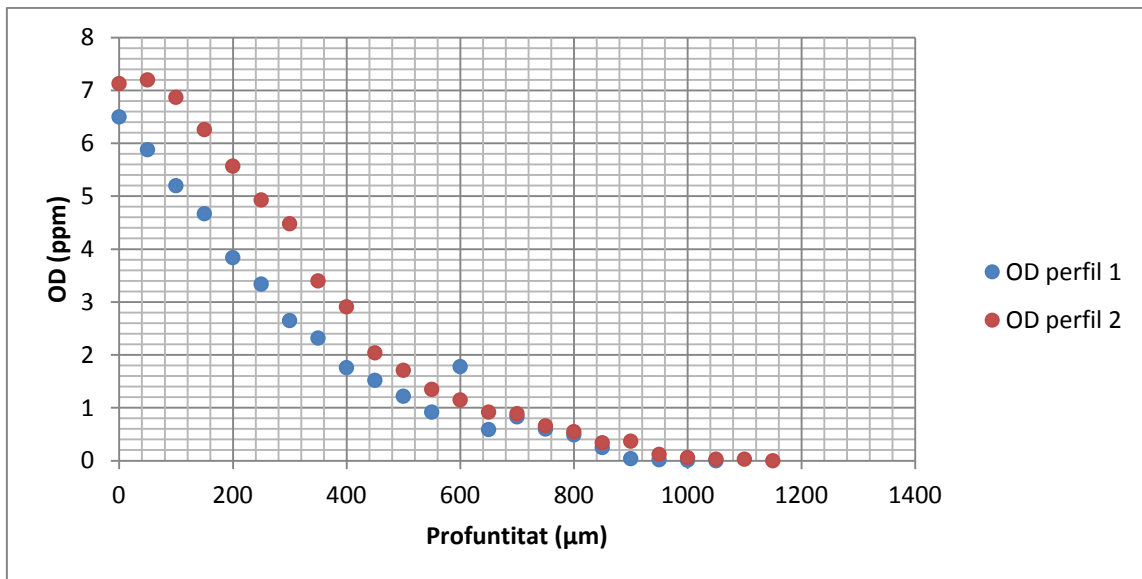


Figura 45. Gràficació de la recta de consum d'oxigen a diferents punts. Aquest conjunt de gràfics està format per la representació de tres punts, on en cada un es van realitzar dos perfils.

Al realitzar els perfils en tres punts diferents i en cada punt dos mesures, com era d'esperar s'obtenen resultats molt semblants, indicant una bona repetitivitat.

Els diferents perfils van ser utilitzats per al càlcul del consum d'oxigen dins de la biopel·lícula, ajustant-los a l'equació 13, que també inclou l'efecte del transport de matèria.

$$D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} = \frac{dC}{dt} = OUR \quad \text{Equació 13}$$

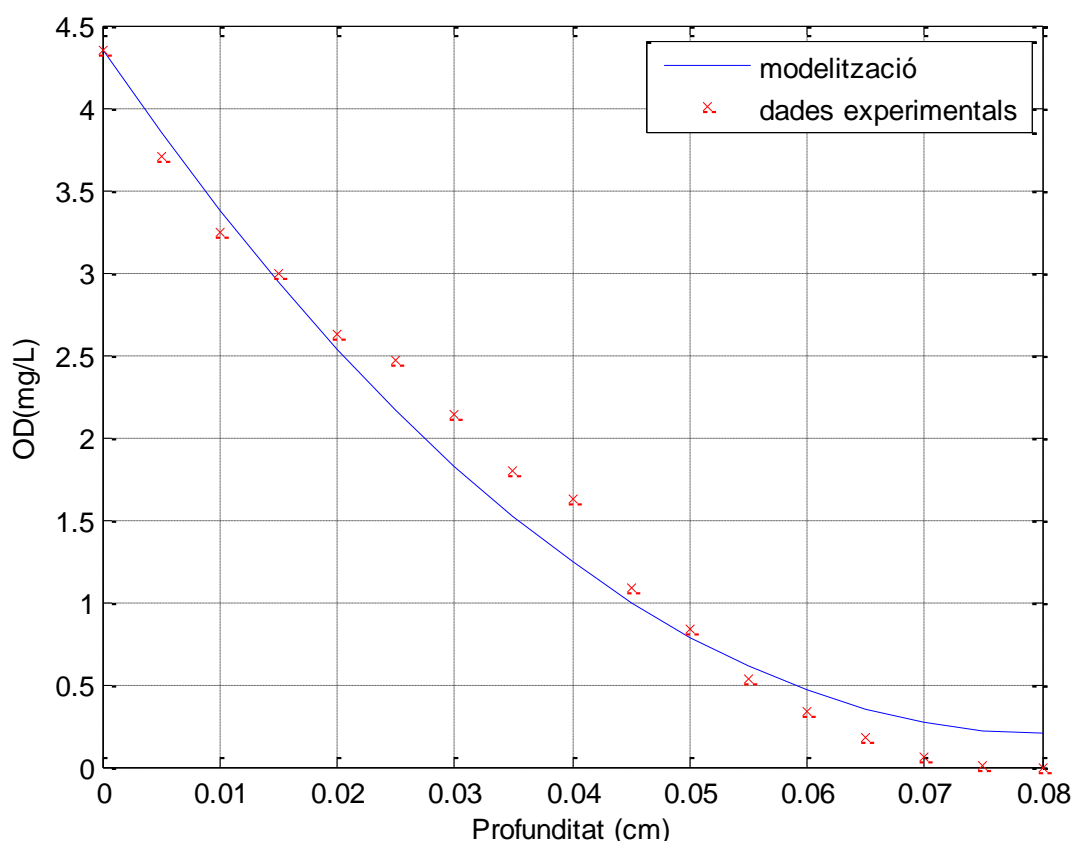


Figura 46. Ajust del de la velocitat de consum del oxigen a partir del perfil de la Figura 45, amb l'equació 13.

Els resultats obtinguts seguint aquest procediment van servir per a la construcció de la corba que es mostraran en la Figura 48. Abans d'això hem de determinar quina quantitat de biomassa té el nostre sistema on hem realitzat les mesures. Per a aquest propòsit fem servir el procediment descrit en anàlisi de proteïna cel·lular en el punt 4.6 i obtenim la següent taula:

Taula 3. Valors de proteïna obtinguts a partir de la biomassa del sistema.

Secció biopel·lícula	1	2	3	4	5
Proteïna [g/L]	2.11	3.01	3.19	4.13	5.81

A continuació, per poder aplicar l'equació 15 per obtenir la q_o , ens fa falta saber el valor de sòlids en suspensió, aquest valor l'obtindrem mitjançant els resultats obtinguts de l'anàlisi de proteïnes amb la correlació que es mostra a continuació:

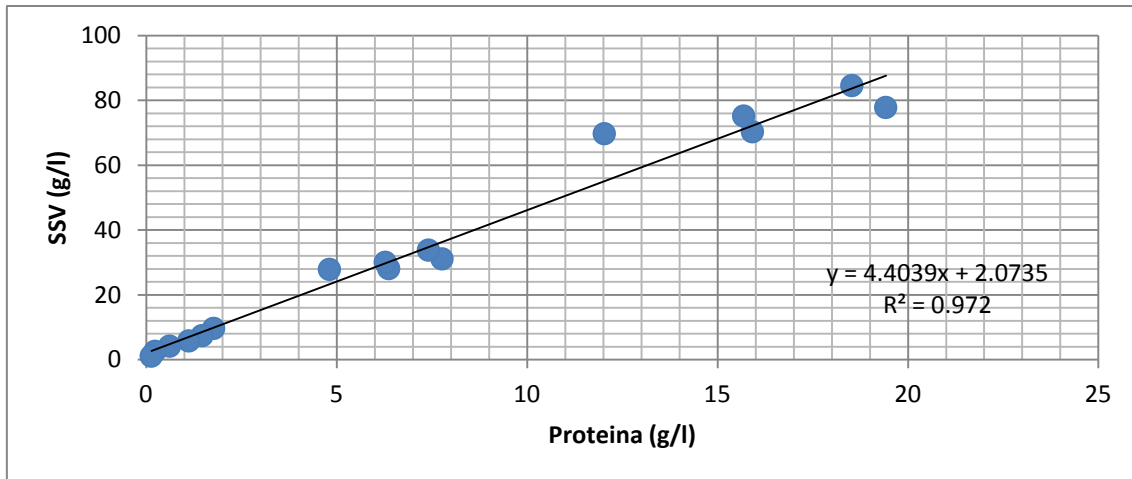


Figura 47. Correlació entre la biomassa (sòlids en suspensió) i les proteïnes.

$$VSS \left[\frac{gVSS}{L} \right] = 4.4029 \cdot Proteïna \left[\frac{g Proteïna}{L} \right]$$

Equació 14. Relació obtinguda a partir de la correlació entre sòlids en suspensió i les proteïnes.

A partir de la correlació anterior obtenim la biomassa del nostre sistema, amb aquestes dades junt amb les obtingudes amb el model, apliquem l'equació 15 per obtenir la q_o .

$$q_o = \frac{\frac{dO}{dt}}{X} \quad \text{Equació 15}$$

Aquesta equació ens permet incloure l'efecte de la concentració de biomassa en el consum d'oxigen, obtenint finalment la Figura 48.

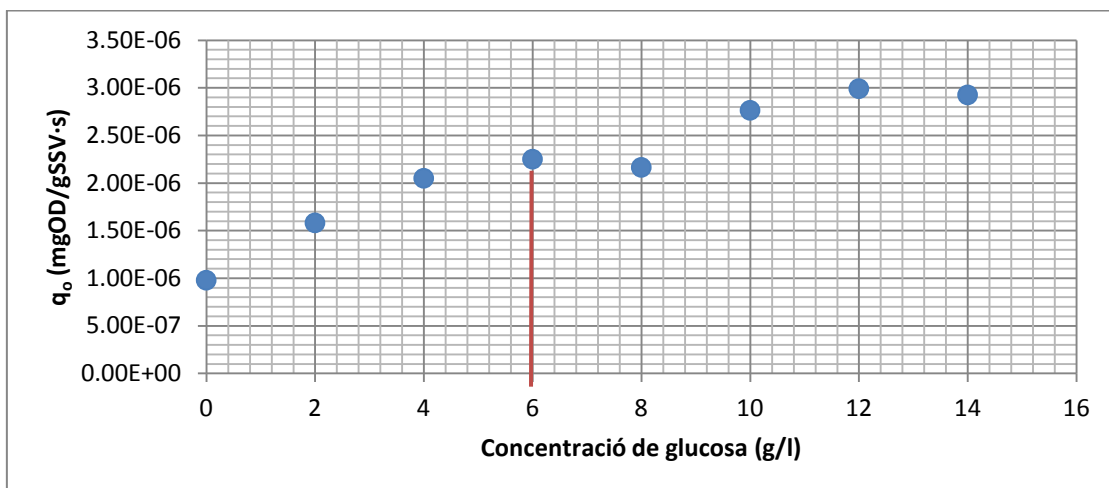


Figura 48. Corba de consum a partir de la cinètica descrita per Monod. La línia vermella determina K_s del nostre sistema.

La biocinètica descrita en la Figura 48 es veu la tendència d'augmentar el consum d'oxigen al augmentar la concentració de substrat que s'introdueix en la biopel·lícula, com era d'espera. Per explicar de forma adequada la corba que hem vist es necessita tenir en compte la OUR del sistema junt amb la cinètica de Monod. Aquest gràfic el que ens mostra és la OUR sense tenir en compte l'oxigen ja que aquest està en excés, per estudiar l'efecte de la glucosa. Per tant del gràfic anterior obtindrem els paràmetres següents, on s'explica com s'han obtingut:

La K_d , de la nostra biopel·lícula el podrem determinar molt fàcilment perquè és el valor que ens marca el primer punt del gràfic quan el sistema es troba en estat endogen.

La $q_{o,max}$, és el valor màxim que es pot apreciar en la Figura 48, aquest paràmetre ens determina quina és la velocitat màxima a la que l'oxigen es consumit.

Per saber el valor de la nostra K_{s1} , haurem de veure on es troba el paràmetre de la $q_{o,max}/2$. Per trobar la velocitat mitjana, $q_{o,max}/2$, normalment, correspon al valor mig entre la $q_{o,max}$ i el 0, però en el nostre cas al tenir una activitat de consum en estat endogen, ens fa variar aquests paràmetre de posició fent que la $q_{o,max}/2$ li correspongui el valor mig entre el primer punt, K_d i la $q_{o,max}$. Una vegada determinat aquest valor en l'eix d'abscisses s'ha de mirar en la corba quin valor li correspondrà en l'eix d'ordenades, igual que es mostra en Figura 48.

Aplicant tots els conceptes anteriors podem fer una taula on es vegin els seus corresponents valors:

Taula 4. Paràmetres de la corba de consum d'oxigen.

Paràmetres obtinguts del gràfic			
K_d (mgOD/gSSV·s)	$q_{o,max}$ (mgOD/gSSV·s)	$q_{o,max}/2$ (mgOD/gSSV·s)	K_{s1} (g/l)
1.00E-06	3.00E-06	2.25E-06	6

Un cop determinats aquests paràmetres, el que ens cal és realitzar el càlcul del segon grup cinètic. Per estudiar l'OUR del segon grup cinètic, sense tenir en compte la concentració de glucosa, es treballa amb excés de glucosa. D'aquesta manera la OUR ens queda simplificada de la següent manera:

$$OUR = q_{\max} \cdot \frac{C_{s2}}{K_{s2} + C_{s2}} + K_d \cdot X \quad \text{Equació 16}$$

Per aconseguir els paràmetres q_{\max} i K_{s2} i (K_d), incorporarem el model de transport de matèria a l'equació, on utilitzarem la K_d , trobada anteriorment:

$$D \cdot \frac{d^2 C}{dx^2} = q_{\max} \cdot \frac{C_{s2}}{K_{s2} + C_{s2}} + K_d \cdot X \quad \text{Equació 17}$$

El procediment seguit per determinar els paràmetres cinètics va consistir en la realització de perfils on la concentració de glucosa que se subministrava al sistema es trobava en excés. Aquests perfils d'oxigen dissolt en la biopel·lícula es van estimar gràcies a l'ús dels microsensores Clark. A continuació, es mostrarà la Figura 49, on es veuen dos perfils d'oxigen dissolt, en l'eix d'ordenades, al llarg de la profunditat de la biopel·lícula, eix d'abscisses.

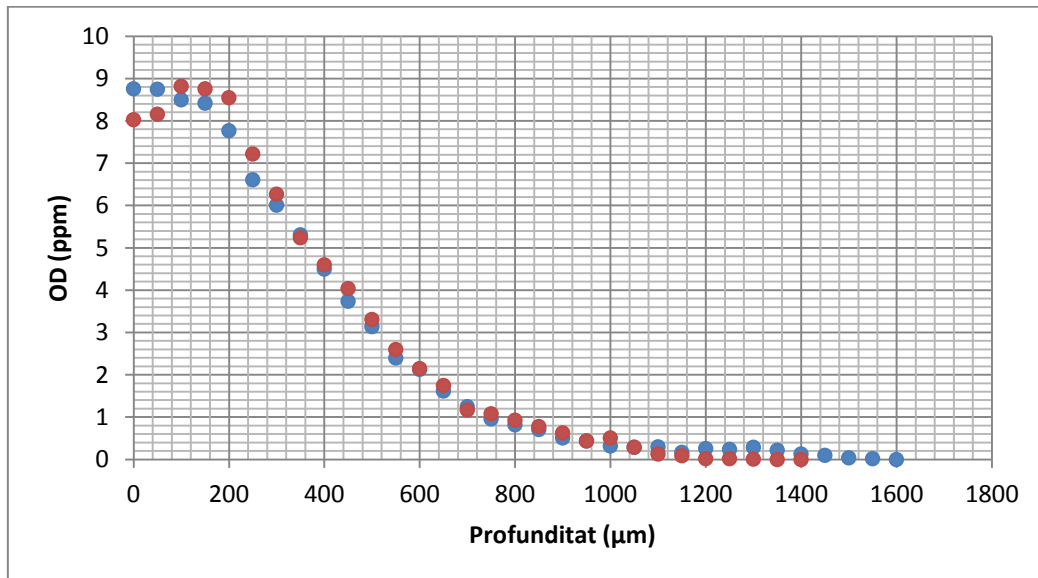


Figura 49. Perfils d'oxigen dissolt obtinguts mitjançant l'ús de microsensores Clark, amb alimentació d'excés de glucosa.

A partir d'aquests perfils i l'equació anterior, es modelitzaran els perfils d'oxigen on la glucosa es trobava en excés per intentar ajustar les dades experimentals al model descrit i obtenir els paràmetres cinètics que ens fan falta per determinar el nostre sistema amb dos substrats. Els resultats obtinguts en aquest ajust es mostren a la Figura 50.

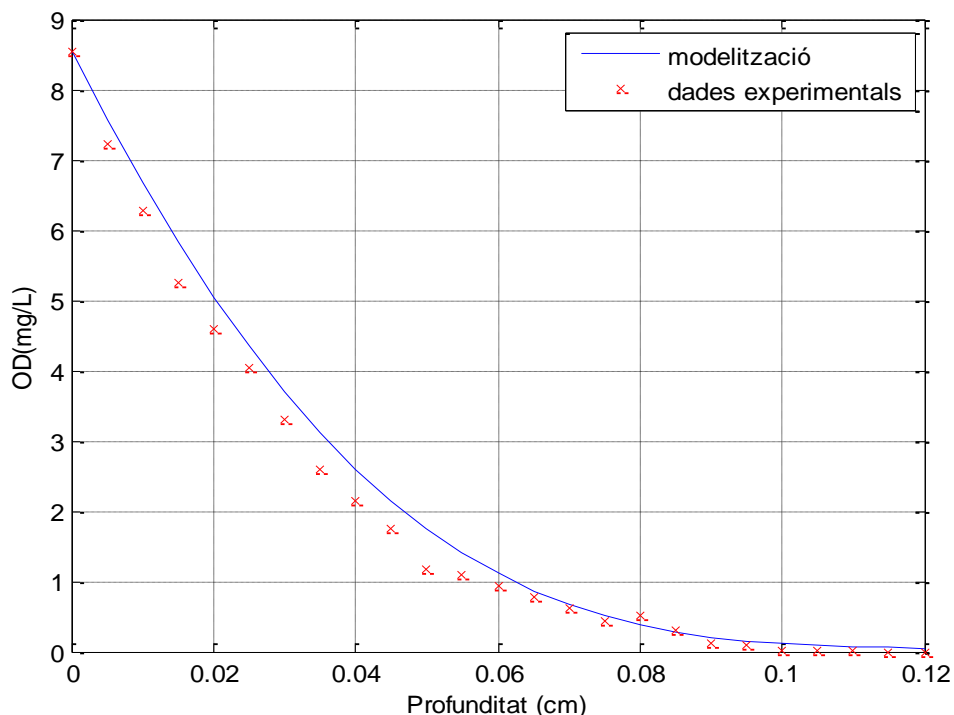


Figura 50. Ajust d'un perfil d'oxigen dissolt amb excés de glucosa.

Resultats obtinguts a partir del model anterior utilitzant la K_d trobada anteriorment, són que la $K_{s2} = 0.5896$ mg/l i la $q_{o,max} = 0.0011$ mgOD/gSSV·s. A primera vista podem veure com que els valors obtinguts són totalment diferents en els dos casos experimentals.

Un cop hem obtingut tots els paràmetres que volíem estudiar a partir dels dos models cinètics, el que farem serà comparar-los amb altres per veure quina diferència podem visualitzar. Els valors bibliogràfics han sigut extrets de (Henze et al. 2002). En aquest llibre trobem una taula on es poden veure els rangs de paràmetres cinètics de l'aigua de depuració en termes municipals:

	Symbol	Unit	Quantity
Maximum specific growth rate	μ_{max}	d^{-1}	4-8
Decay constant	b	d^{-1}	0.1-0.2
Saturation Constant for substrate	K_s COD	$g\ COD/m^3$	5-30
Saturation Constant for oxygen	K_s O ₂	$g\ O_2/m^3$	0.5-1
Maximum yield constant	$Y_{max\ H}$	$g\ COD / g\ COD$	0.5-0.7

Figura 51. Constants de reacció de conversions aeròbiques de heteròtrofs, en terminis municipals de depuració d'aigües a 20°C (Henze et al. 2002).

En la figura anterior, podem observar alguns dels paràmetres que hem obtingut a partir de la cinètica. Si continuem fent recerca bibliogràfica per comparar encara més en (Tchobanoglous et al. 2002), trobem aquestes dos figures que mostren a continuació amb diferents paràmetres cinètics:

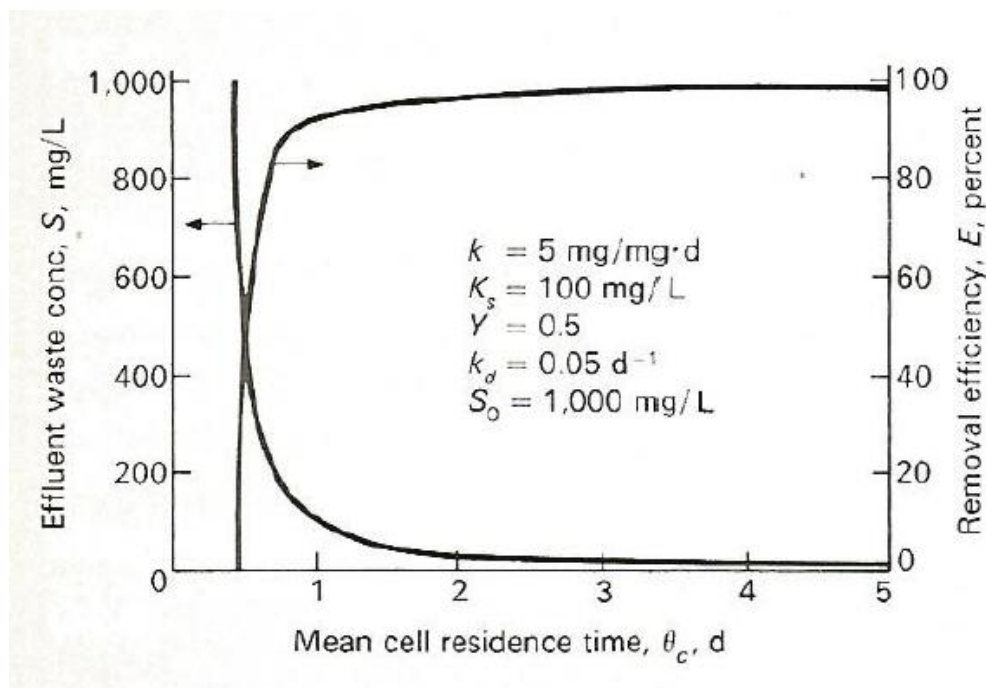


Figura 52. Concentració de residus i eficiència de eliminació en vers el temps de residència cel·lular en un reactor de mescla completa sense recirculació, dades adoptades de (Tchobanoglous et al. 2002). La k de la figura representa la $q_{o,max}$ del nostre treball, i la k_d , s'ha de dividir pel rendiment per poder comparar-la amb la obtinguda per nosaltres.

TABLE 8-7
Typical kinetic coefficients for the activated-sludge process for domestic wastewater^a

Coefficient	Basis ^c	Value ^b	
		Range	Typical
k	d^{-1}	2–10	5
K_s	mg/L BOD ₅	25–100	60
	mg/L COD	15–70	40
Y	mg VSS/mg BOD ₅	0.4–0.8	0.6
k_d	d^{-1}	0.025–0.075	0.06

^a Derived in part from Refs. 12, 19, and 42.

^b Values reported are for 20°C.

^c VSS = volatile suspended solids.

Note: $1.8(^{\circ}C) + 32 = ^{\circ}F$

Figura 53. Coeficients cinètics típics per a processos de llots actius per a aigües residuals domèstiques, taula adoptada de (Tchobanoglous et al. 2002). Per comparar els valors del gràfic la k , s'ha de dividir pel rendiment per comparar amb la $q_{o,max}$, al igual que la k_d , amb la nostra K_d .

Les referències bibliogràfiques anteriors han sigut obtingudes de sistemes amb la biomassa en suspensió. Per tal de comparar els resultats biocinètics de la biopel·lícula immobilitzada amb altres on s'han realitzat mesures amb les mateixes condicions, trobem resultats com els tabulats a continuació.

Table 2 – Computed $\hat{q}_{\max,20}$ and K_o of self-forming dynamic membrane during its bio-fouling process			
Time	Temperature (°C)	$\hat{q}_{\max,20}$ (mgDO/gSSh)	K_o (mgDO/L)
1st day	14.5	11.1	0.65
2nd day	17.0	8.4	0.23
5th day	21.0	4.7	0.16
6th day	21.0	4.8	0.75
8th day	21.0	3.8	0.44

Figura 54. Tabulació de paràmetres cinètics bibliogràfics a partir de biopel·lícules immobilitzades. Figura adoptada de (Zhou et al. 2008).

Adaptant els valors obtinguts en l'experimentació amb els de les dades bibliogràfiques obtenim la següent taula on estan classificats per veure les semblances entre ells:

Taula 5. En aquesta taula es troben tabulats tots els valors obtinguts experimentalment en l'estudi de la biocinètica, tant amb en excés d'oxigen com en el de la glucosa. També estan tabulats paràmetres bibliogràfics per comparar els valors experimentals.

Paràmetres	Paràmetres modelitzats amb oxigen en excés	Paràmetres modelitzats amb glucosa en excés	Paràmetres Figura 51	Paràmetres Figura 52	Paràmetres Figura 53	Paràmetres Figura 54
$q_{o\max}$ (mgOD/mgSSV·s)	$3 \cdot 10^{-6}$	$1.10 \cdot 10^{-3}$	0.1157	0.0578	0.096	$1.14 \cdot 10^{-3}$
K_{s1} (g/l)	6	-	0.005 – 0.03	0.1	0.06	-
K_{s2} (g/l)	-	$5.89 \cdot 10^{-4}$	$7.5 \cdot 10^{-4}$	-	-	$4.46 \cdot 10^{-4}$
K_d (mgOD/gSSV·s)	$1 \cdot 10^{-6}$	$1 \cdot 10^{-06}$	-	$4.17 \cdot 10^{-4}$	$1.16 \cdot 10^{-3}$	-

En la discussió de la cinètica estudiada en aquest apartat, podem dir que el mètode que hem utilitzat per estudiar el primer grup cinètic, no és el correcte ja que com hem pogut observar la corba que descrivia el consum d'oxigen de la Figura 48, no ens mostrava una bona tendència com la que nosaltres esperàvem, al comparar-la amb la Figura 5. No obstant, això no ens ha impedit el propòsit d'aconseguir els paràmetres cinètics a partir d'aquest mètode. Una limitació que nosaltres teníem a l'hora d'aconseguir determinar els paràmetres, era que no podíem mesurar la glucosa a l'interior de la biopel·lícula per poder trobar la K_{s1} , per tant, per limitacions

experimentals hem hagut de suposar que la concentració a l'interior de les biopel·lícules era la mateixa que la subministrada.

En canvi, al passar a analitzar el segon grup cinètic, veiem com que l'ajust realitzat amb el model proposat és molt bo, i que al final ens ha proporcionat les dades cinètiques que ens faltava per poder realitzar la comparació de les dades experimentals amb les bibliogràfiques.

Al comparar les dades bibliogràfiques amb les dades experimentals podem veure com que l'experimentació realitzada a partir de la corba de consum d'oxigen com s'ha dit anteriorment no ens aporta uns paràmetres fiables per a l'estudi de la biopel·lícula ja que no s'assemblen als bibliogràfics, Figura 54. En canvi, els del segon grup cinètic són molt semblants als de la figura comentada anteriorment, ja que aquests també pertanyien a un estudi amb la biomassa immobilitzada.

Per altre banda s'han comparat els resultats obtinguts en aquest estudi amb els paràmetres bibliogràfics trobats per a sistemes amb biomassa en suspensió, que es mostren en les primeres taules. En aquesta comparació veiem com la utilització d'aquests resultats per a descriure l'activitat de microorganismes que creixen immobilitzats comportaria el sobredimensionament de la biocinètica, al no haver-se tingut en compte el factor de la transferència de matèria en la seva determinació.

Per tant, tot i les limitacions que en encara presenta la metodologia descrita en aquest treball, la utilització de sistemes amb biomassa immobilitzada per a la caracterització de les seves biocinètiques suposa una millora a la utilització de paràmetres de cultius en suspensió.

6. Conclusions

A través de l'observació i de l'anàlisi dels resultats obtinguts en les diferents experimentacions realitzades durant l'elaboració del projecte per a la caracterització de les biopel·lícules, hem pogut extreure un seguit de conclusions que ens permeten saber més sobre les característiques d'aquesta biopel·lícula.

La primera conclusió a la que vam poder arribar, és que els microsensores són una eina molt útil i molt potent per a la clarificació dels fenòmens que tenen lloc a l'interior de les biopel·lícules que van estudiar.

A partir de l'anàlisi de totes les experimentacions realitzades en el projecte, tant amb els microsensores tipus Clark com els MEMS, vam poder avançar en el coneixement de transport de matèria a l'interior de les biopel·lícules. En aquests resultats es va poder visualitzar com la resistència de l'oxigen augmentava a mesura que la profunditat també ho feia, de manera que la difusió de les molècules d'oxigen es fa més complicada a mesura que va avançant en la biopel·lícula.

A més a més, a partir dels perfils enregistrats a l'interior de la biopel·lícula, en diferents moments del seguiment realitzat, vam poder entendre millor quin efecte tenia sobre la biopel·lícula l'activitat dels microorganismes. A partir de l'activitat metabòlica obtinguda amb el model realitzat durant l'estudi de la dinàmica de la biopel·lícula amb els microsensores Clark, s'observa que quan s'alimenta amb substrat l'activitat metabòlica augmenta, com era d'esperar. Aquest augment de l'activitat metabòlica és degut al consum del substrat amb el qual s'ha alimentat la biopel·lícula. Això comporta a que l'oxigen que hi ha dissolt també sigui consumit per degradar el substrat, fent que la profunditat aeròbia disminueixi. En canvi, quan no s'alimenta amb substrat l'efecte és totalment al contrari, l'activitat metabòlica disminueix perquè no hi ha el mateix consum de substrat i la profunditat aeròbia augmenta perquè aquest oxigen no és consumit a la mateixa velocitat i, per tant, es difon entre la biopel·lícula arribant a majors profunditats. Aquest comportament també l'hem pogut observar amb la utilització dels microsensores MEMS. En aquest cas es va poder observar el comportament dinàmic de forma que al passar d'un estat endogen, l'oxigen es difonia per la biopel·lícula amb més facilitat, arribant a concentracions més altes. En canvi, al començar a subministrar substrat, les concentracions d'oxigen, al igual que al observat amb les Clark, disminueixen.

Un altre aspecte que es va analitzar és l'efecte de les condicions hidrodinàmiques sobre el comportament de les biopel·lícules. En primer lloc es va estudiar la incidència dels cabals en el sistema fent variacions en aquests i canviant l'alimentació de substrat que se li subministrava a la biopel·lícula. La conseqüència que es pot extreure analitzant el comportament observat en l'experimentació és que el consum d'oxigen és baix, quan la biopel·lícula es troba en estat endogen, fent que al augmentar el cabal l'oxigen es difongui amb més facilitat entre la biopel·lícula arribant a profunditats aeròbies més grans. En canvi, al començar a alimentar amb substrat el comportament de la biopel·lícula varia fent que les profunditats aeròbies disminueixin al difondre's les molècules de substrat per la biopel·lícula i, a més velocitat de circulació menys profunditat aeròbia. Per tant, les relacions de cabal i profunditat aeròbia són: a major fluïdesa en estat endogen, més profunditat aeròbia; a major fluïdesa amb alimentació de substrat, menys profunditat aeròbia.

Per altra banda l'efecte de la hidrodinàmica del sistema també es va analitzar a partir de l'estudi de la dinàmica de les biopel·lícules en els 35 dies d'experimentació. En els perfils enregistrats amb els Clark, es van poder observar els efectes que provoquen la hidrodinàmica del sistema en la biopel·lícula, fent que la resposta de les diferents seccions no fos la mateixa. En l'experimentació descrita en 5.1.2, es va poder veure com la hidrodinàmica de les dos primeres seccions era molt millor que les dues últimes. Aquest fet es pot deure a que la seva situació era favorable per rebre el substrat en millors condicions al estar al principi del reactor. Una altra possible explicació podria ser l'acumulació de biomassa al final del reactor que provoca la difícil difusió de les molècules i el deteriorament de les biopel·lícules en les seccions 3 i 4 (tram final del reactor), ja que en totes les experimentacions es va trobar que el gruix de la biopel·lícula en les dos últimes seccions era més gran i el seu comportament no seguia una tendència clara.

Pel que fa a la caracterització de la biocinètica a partir de mesures realitzades en l'interior de les biopel·lícules, en les experimentacions per obtenir els paràmetres cinètics a partir del model de la corba de consum d'oxigen descrit en la memòria, no s'ha tingut bons resultats en el càlcul del primer grup cinètic, a causa de les limitacions que teníem experimentalment. Els valors experimentals estimats amb els models són molt diferents als valors bibliogràfics, per tant podem dir que la experimentació realitzada per comparar els paràmetres no és l'adequada. No obstant, el segon grup cinètic sí que ens ha donat uns resultats que al comparar-los bibliogràficament amb paràmetres en les mateixes condicions veiem que són molt semblants. Per tant podem dir que per aquesta part, els paràmetres cinètics són correctes.

Paral·lelament a aquests estudis, durant el seguiment del reactor de placa plana durant 35 dies, també es va analitzar el comportament del pH. El que es va observar és que l'alimentació de substrat a més de provocar canvis en les concentracions d'oxigen dissolt i en el creixement de la biomassa, també provoca canvis en el pH. Durant les experimentacions que es van realitzar mesures de pH, aquest es mantenia constant a mesura que augmentava la profunditat, amb una petita tendència a disminuir. El pH en condicions endògenes era de 7 i amb càrrega de substrat era de 5. L'efecte d'aquests canvis de pH que es van observar dins de la biopel·lícula van tenir un efecte molt important en el seu funcionament, tal i com es va observar en el seguiment de l'activitat. Una càrrega massa elevada de substrat ens va provocar un desajust en les condicions òptimes per als microorganismes que va reduir la seva activitat, i a més a més van provocar l'aparició de fongs, que introduïen dificultats tècniques per a l'enregistrament de perfils. Per tant, tal i com se sap el control de les càrregues d'entrada i del pH dins dels sistemes d'estudi són clau per a un bon funcionament de les biopel·lícules.

Finalment, quan comparem els resultats obtinguts utilitzant els diferents sensors, podem dir que els dos són totalment vàlids per poder fer perfils i caracteritzar la biopel·lícula, ja que com s'ha observat en l'experimentació això ha estat possible. En quant a nivell de prestacions, els Clark ens han anat molt bé a l'hora de realitzar perfils, però tenen la limitació de que no és pot estudiar la dinàmica de la biopel·lícula durant un període de temps determinat. En canvi, els microsensors MEMS supleen aquesta característica perquè es poden deixar durant el període de temps que es vulgui prenent mesures en el seu interior. A més a més, també ens permet obtenir diferents mesures simultànies gràcies als seus elèctrodes instaurats en la seva punta. Per tant, com a conclusió, els microsensors Clark i MEMS són bons per experimentar i obtenir dades de la biopel·lícula, però els MEMS tenen unes condicions més versàtils fent que el ventall d'opcions per possibles experimentacions sigui més ampli, com a l'hora d'estudiar la dinàmica de la biopel·lícula i realitzar més d'un perfil simultani.

7. Treball futur

Les biopel·lícules que nosaltres hem estudiat tenen encara moltes característiques que nosaltres tot i haver realitzat múltiples experiments no s'ha pogut estudiar. Per tant per desenvolupar aquest apartat on exposem una sèrie d'idees per a possibles investigacions en aquest àmbit.

En relació a les possibilitats que ens ofereixen els microsenors amb tecnologia MEMS per a la monitorització de biopel·lícules, es podria mirar de realitzar seguiments de períodes més llargs de temps. Aquesta aplicació també es podria realitzar treballant amb diferents microorganismes. Per altra banda, també seria interessant aprofitar aquesta tecnologia per analitzar la dinàmica de la biopel·lícula davant de múltiples canvis en diferents condicions d'operació.

Pel que fa als microsenors Clark una possible millora seria la automatització de l'adquisició de perfils a l'interior de la biopel·lícula, actualment molt laboriosa i poc versàtil. Amb aquest objectiu s'està treballant en el desenvolupament d'un sistema format per un macromanipulador automàtic en 3D.

Un aspecte a treballar seria la caracterització de la biocinètica de biopel·lícules, intentant millorar els resultats obtinguts, repetint els experiments duts a terme o millorant el model utilitzat en aquest treball.

Per altra banda, l'estudi de biopel·lícules en casos específics com els microorganismes sulfuroxidants. En aquesta temàtica el que es miraria d'aplicar a aquests microorganismes es la monitorització mitjançant els microsenors Clark (OD, pH i H_2S) i els de tecnologia MEMS (OD i pH, que s'estan desenvolupant).

Finalment tot el propòsit d'aquests treballs és poder aplicar totes aquestes tècniques de monitorització, que s'estan realitzant en els equips a escala laboratori, a equips reals i d'escala industrial.

Referències

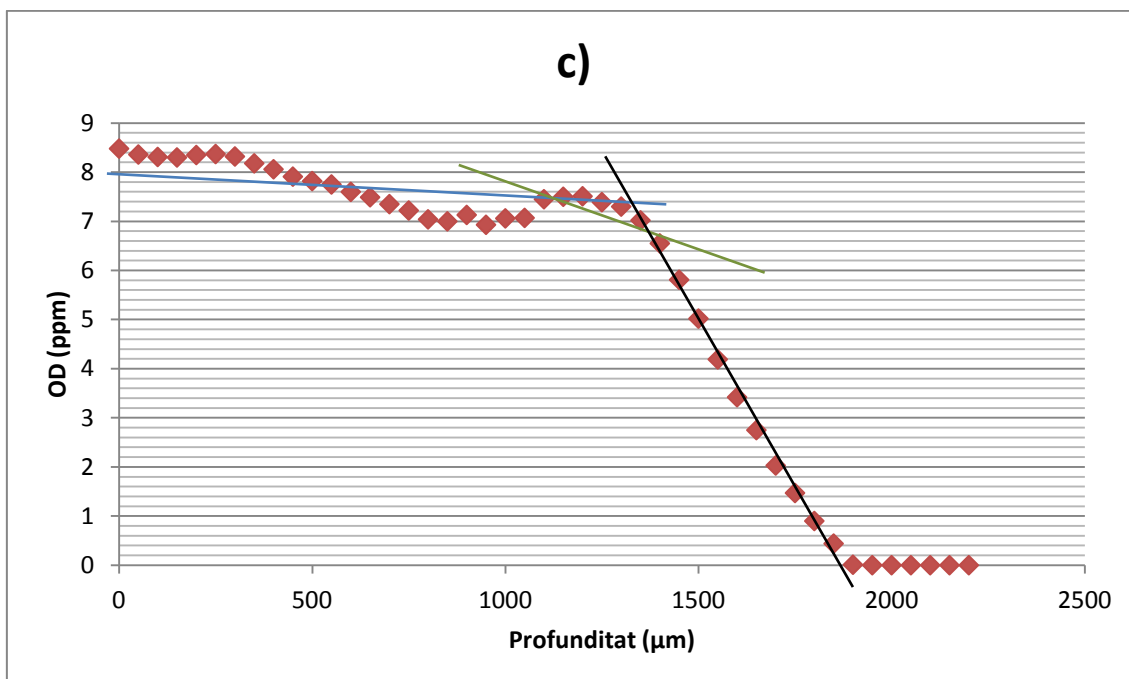
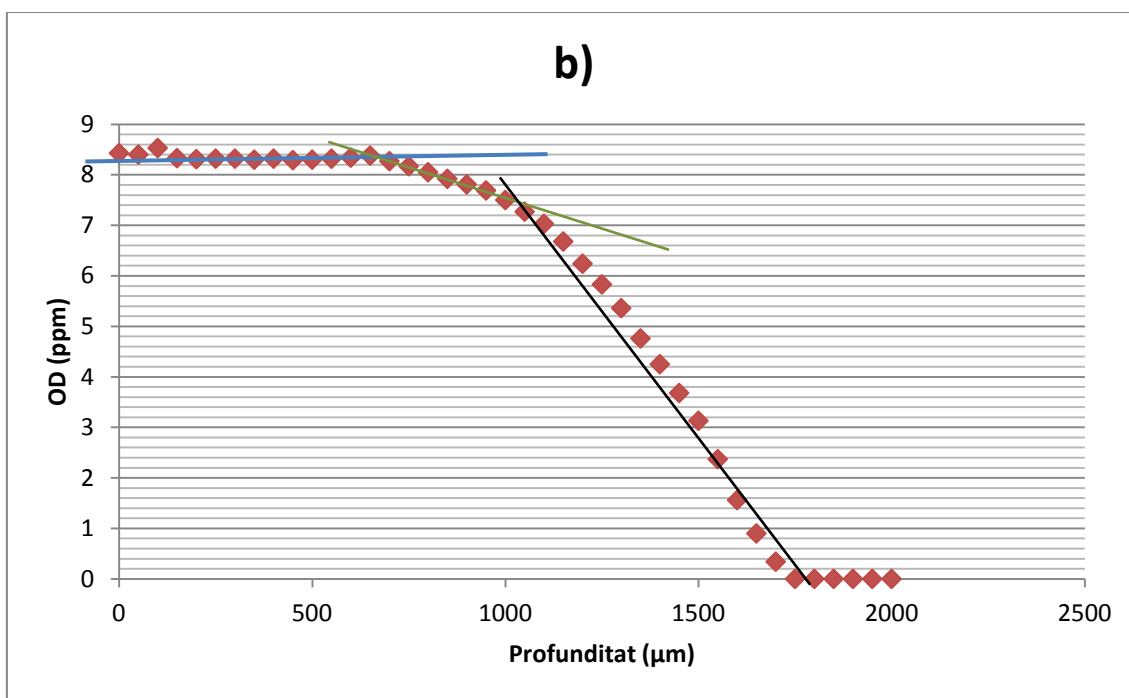
- Alcón, M.A., García-Ochoa Soria, F. & Santos Mazorra, V.E., 2005. *Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: aplicación a la producción de xantano*. Universidad Complutense de Madrid.
- Animalesweb S.L, 2014. Medioambiente: Tratamiento de gases en la explotación ganadera: fundamentos de la biofiltración. Available at: http://www.3tres3.com/medioambiente/tratamiento-de-gases-en-la-explotacion-ganadera-fundamentos-de-la-bio_2175/ [Accessed November 9, 2014].
- Bryers, J. & Characklis, W., 1981. Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: Overall kinetics. *Elsevier Ltd*, 15(4), pp.483–491.
- Casey, E., Glennon, B. & Hamer, G., 2000. Biofilm development in a membrane-aerated biofilm reactor: effect of intra-membrane oxygen pressure on performance. *Bioprocess Engineering*, 23(5), pp.457–465.
- Certificación, O. instituto de, Ambientum.com - Enciclopedia Medioambiental - Atmosfera - Los contaminantes atmosfericos. Available at: http://www.ambientum.com/enciclopedia_medioambiental/atmosfera/Los-contaminantes-atmosfericos.asp [Accessed November 8, 2014].
- Davis, D., 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms Monroe. *D PLoS Biology*, 5(11), p.307.
- Dorado, A.D. et al., 2012. Biomass accumulation in a biofilter treating toluene at high loads - Part 1: Experimental performance from inoculation to clogging. *Chemical Engineering Journal*, 209(7), pp.661–669.
- Eberl, H.. et al., 2000. A three-dimensional numerical study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms. *Chemical Engineering Science*, 55, pp.6209–6222.
- Envitech, C., Contaminación Atmosférica por Olores - Ingeniería ambiental al servicio del sector industrial. *Condorchem Envitech*. Available at: <http://blog.condorchem.com/contaminacion-atmosferica-por-olores/> [Accessed November 8, 2014].
- Gao, F. & Han, L., 2012. Implementing the Nelder-Mead simplex algorithm with adaptive parameters. *Computational Optimization and Applications*, 51(1), pp.259–277.
- García, F.M.P., 2012. bioflitre percolador. , p.198. Available at: <http://rodin.uca.es/xmlui/bitstream/handle/10498/15169/b36205515.pdf?sequence=1> [Accessed April 14, 2015].
- Ghose, T.K., Fiechter, A. & Blakebrough, N., 1976. *Advances en biochemical Engineering* Vol. 4. Tarun K. Ghose, ed., Springer Science & Business Media, 1976.

- Guimerà, X. et al., 2014. Biofilm dynamics characterization using a novel DO-MEA sensor: mass transport and biokinetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 14(5821), pp.1–14.
- Guimerà, X. et al., 2013. *Treball de Fi de Màster Desenvolupament d'un microsensor d'oxigen dissolt per al monitoratge de biopel·lícules*. Universitat Politècnica de Manresa.
- Henze, M. et al., 2002. *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes* Third Edit. F. U, J. M. Robert, & W. H. Rulkens, eds., Berlin: Springer.
- Heymes, F. et al., 2006. Hydrodynamics and mass transfer in a packed column: Case of toluene absorption with a viscous absorbent. *Chemical Engineering Science*, 61(15), pp.5094–5106.
- Horn, H. & Hempel, D.C., 1997. Substrate utilization and mass transfer in an autotrophic biofilm system: Experimental results and numerical simulation. *Biotechnology and bioengineering*, 53, pp.363–371.
- Jeroschewski, P., Steuckart, C. & Kühl, M., 1996. An Amperometric Microsensor for the Determination of H₂S in Aquatic Environments. *American Chemical Society*, 68(No.24), pp.1–7.
- Lawrence, J. et al., 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 173(20), pp.6558–6567.
- Lee, J.H., Seo, Y., et al., 2007. MEMS needle-type sensor array for in situ measurements of dissolved oxygen and redox potential. *Environmental Science and Technology*, 41(22), pp.7857–7863.
- Lee, J.H., Lim, T.S., et al., 2007. Needle-type dissolved oxygen microelectrode array sensors for in situ measurements. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 128, pp.179–185.
- Masciarelli, R., Stancich, S. & Stoppani, F., 2012. *Cátedra de Ing. De las Reacciones*. Universidad Tecnológica Nacional.
- Masuda, S., Watanabe, Y. & Ishiguro, M., 1991. Biofilm Properties and Simultaneous Nitrification and Denitrification in Aerobic Rotating Biological Contactors. *Water Science & Technology*, Vol 23(No 7-9 pp), pp.1355–1363.
- Melo, L.F., 2005. Biofilm physical structure, internal diffusivity and tortuosity. *Water Science and Technology*, 52(No 7), pp.77–84.
- Monod, J., 1949. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3(x), pp.371–394.
- Moya, A. et al., 2014. Biofilm oxygen profiling using individually addressable disk microelectrodes on a microfabricated needle. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Submitted(1405-4), pp.1–9.

- Mudliar, S. et al., 2008. Steady state model for evaluation of external and internal mass transfer effects in an immobilized biofilm. *Bioresource Technology*, 99(7), pp.3468–3474.
- Res, W. et al., 1985. Mass Transfer Mechanisms in a Heterotrophic. , 19(Ii), pp.1369–1378.
- Revsbech, N.P. et al., 1983. Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S, and pH profiles of a microbial mat. *Limnology and Oceanography*, 28(6), pp.1062–1074.
- Revsbech, N.P. & Jorgensen, B.B., 1986. Microelectrodes: Their Use in Microbial Ecology. *K.C. Marshall*, 9(7), p.65.
- Santos, V.E. et al., 2006. Oxygen uptake rate measurements both by the dynamic method and during the process growth of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8: Modelling and difference in results. *Biochemical Engineering Journal*, 32(3), pp.198–204.
- Tchobanoglous, G., Burton, F. & Stensel, H.D., 1991. Wastewater engineering: An Overview. *Wastewater Engineering Treatment and Reuse*, 4(1), pp.1–24.
- Tchobanoglous, G., Burton, F.L. & Stensel, H.D., 2002. *Wastewater engineering* Third Edit. J. B. Cark & J. M. Morris, eds., Singapore: Metcalf and Eddy.
- Uzcudun, Í.L., 2005. Biofilms bacterianos. *Sem*, 37(14), pp.14–18.
- W, S., Horn, H. & Hempel, D.C., 2002. Influence of growth conditions on biofilm development and mass transfer at the bulk/biofilm interface. *Measurement*, 36(9), pp.4775–4784.
- Yurt, N. et al., 2003. Quantifying selected growth parameters of *Leptothrix discophora* SP-6 in biofilms from oxygen concentration profiles. *Chemical Engineering Science*, 58(9), pp.4557–4566.
- Zhang, T.C. & Bishop, P.L., 1994. Density, porosity, and pore structure of biofilms. *Water Research*, 28(11), pp.2267–2277.
- Zhou, X.H. et al., 2008. Function of self-forming dynamic membrane and biokinetic parameters' determination by microelectrode. *Water Research*, 42(10-11), pp.2369–2376.
- Zhou, X.-H. et al., 2009. A new approach to quantify spatial distribution of biofilm kinetic parameters by in situ determination of oxygen uptake rate (OUR). *Environmental science & technology*, 43(3), pp.757–763.
- Zhu, X. et al., 2001. Biofilm structure and mass transfer in a gas phase trickle-bed biofilter. *Water Science and Technology*, 43(No 1), pp.285–293.

Apèndix 1: Perfils per a la identificació de les diferents fases del reactor.

En aquest apartat de l'apèndix el que trobarem són exemples del que s'ha realitzat per les diferents perfils de les seccions del nostre bioreactor, on en alguns casos també s'havien fet mesures de pH que han estat incloses en el mateix gràfic.



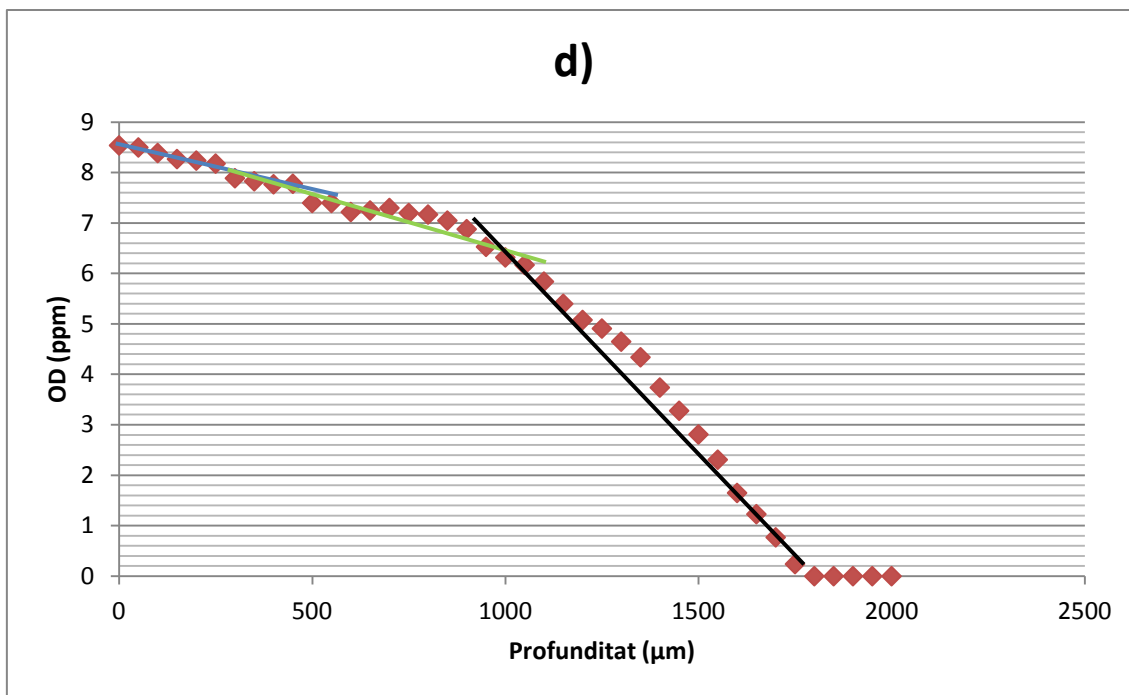
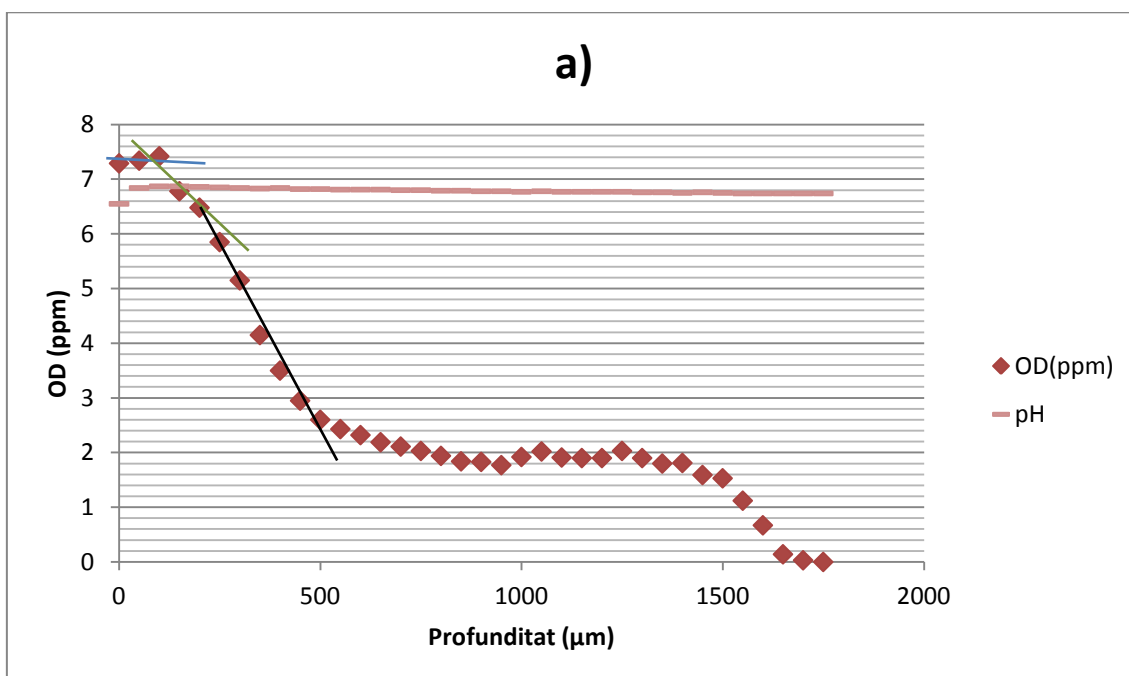
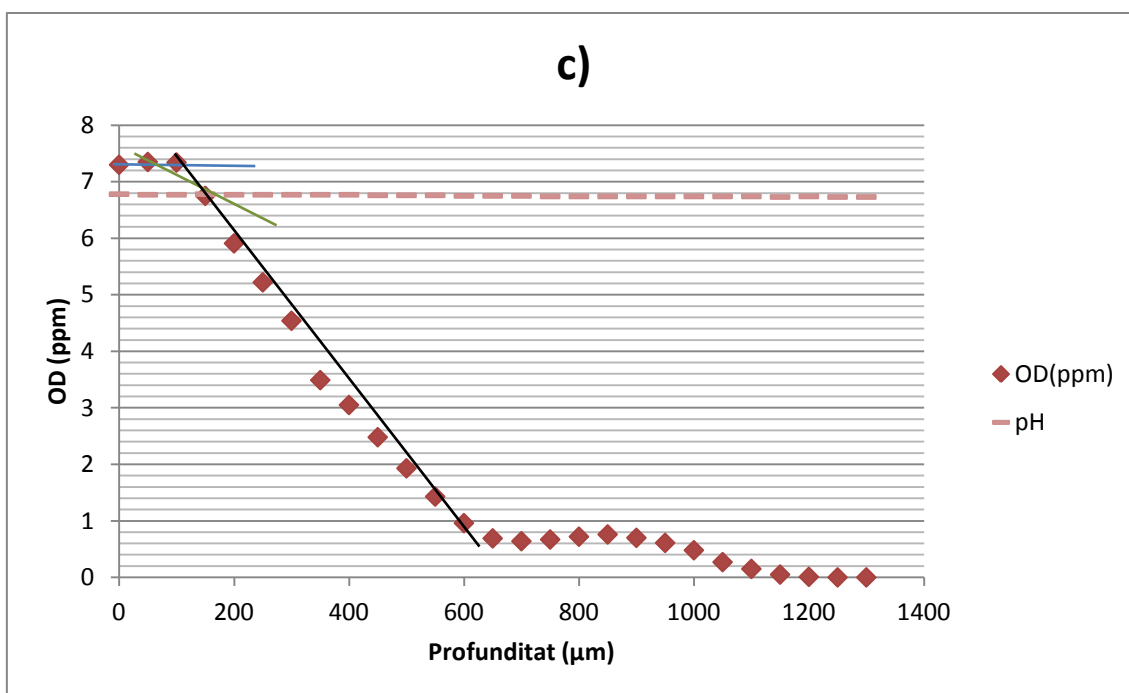
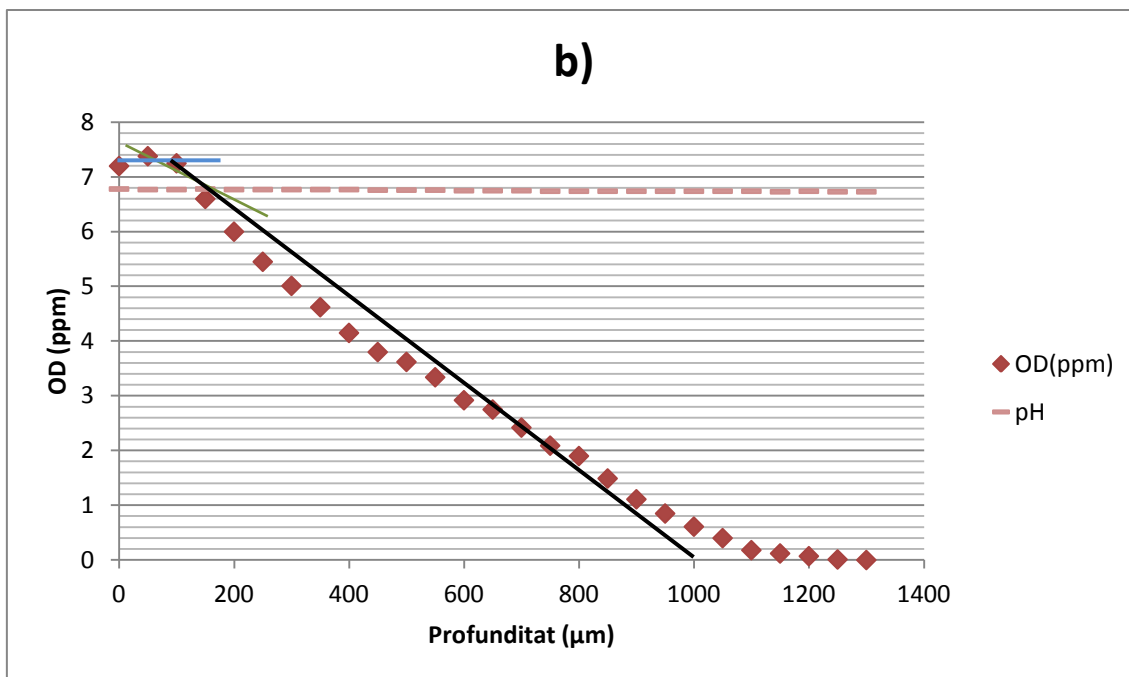


Figura 55. Gràfic del perfil mitjançant els microsensores Clark de la biopel·lícula en estat endògena en el dia 6 d'experimentació. El gràfic està diferenciat per 3 zones d'experimentació, ja que la secció 1 s'ha exposat en la memòria. Figura 55. b) representa a la secció 2, la Figura 55. c) representa a la secció 3 i per finalitzar la Figura 55. d) representa la secció 4. Es detalla la zona líquida amb una línia blava, la interfase amb una línia verda i la zona de biopel·lícula aeròbia amb la negra.





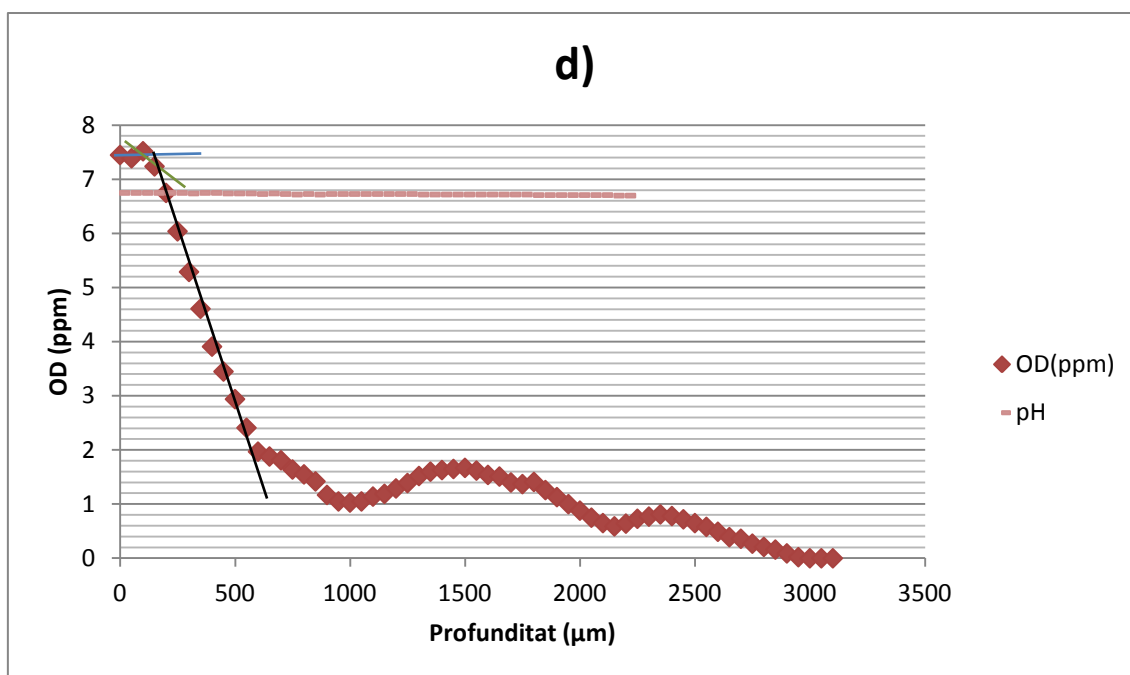
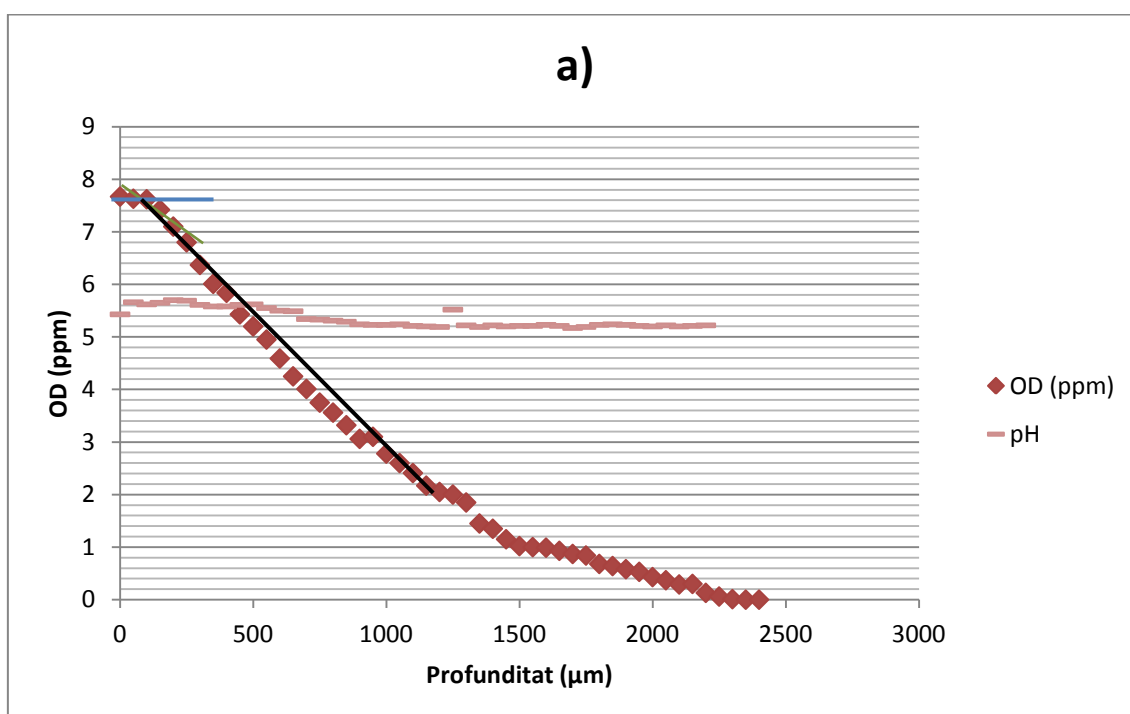
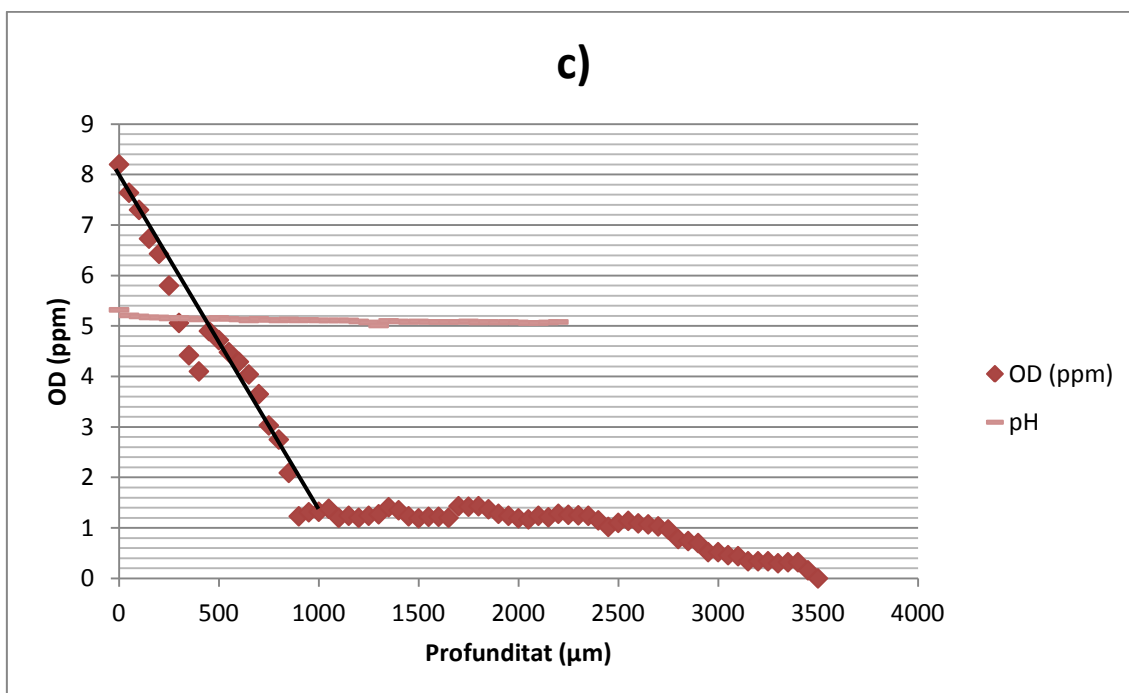
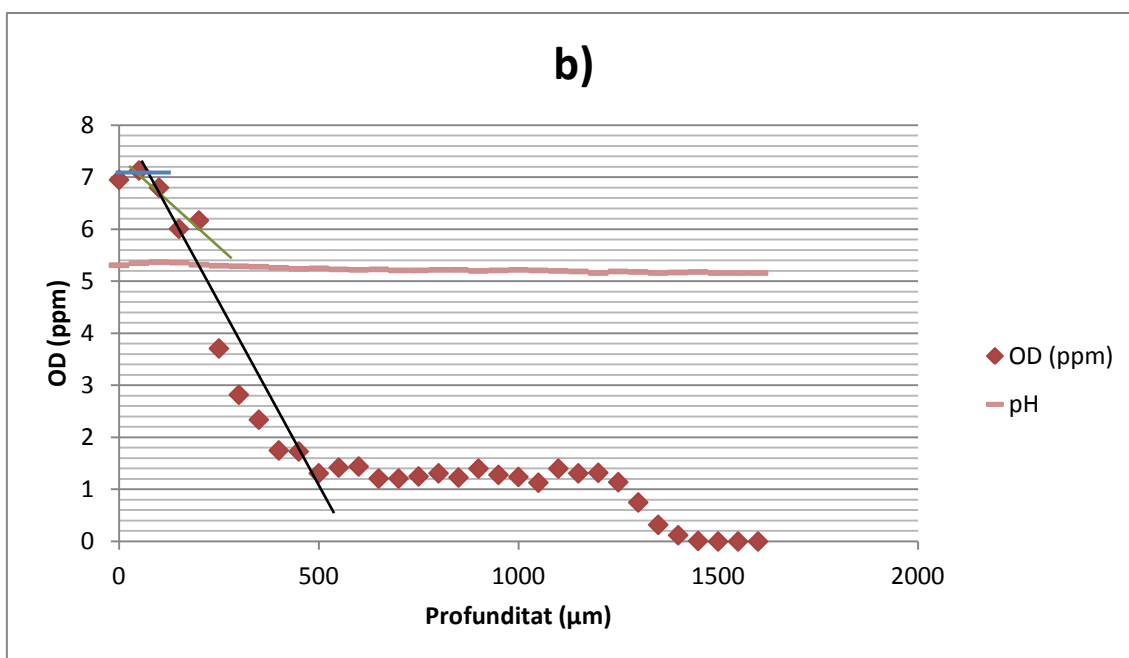


Figura 56. Gràfic del perfil mitjançant els microsensores Clark de la biopel·lícula en estat endògena en el dia 26 d'experimentació. El gràfic està diferenciat per 4 zones d'experimentació, la Figura 56. a) representa a la secció 1, la Figura 56. b) representa a la secció 2, la Figura 56. c) representa a la secció 3 i per finalitzar la Figura 56. d) representa la secció 4. Es detalla la zona líquida amb una línia blava, la interfase amb una línia verda i la zona de biopel·lícula aeròbia amb la negra.

Seguidament grafiquem un perfil amb diferents característiques ja que aquest ha estat alimentat amb 12g/l de glucosa com a substrat i ha estat realitzat el dia 28 d'experimentació.





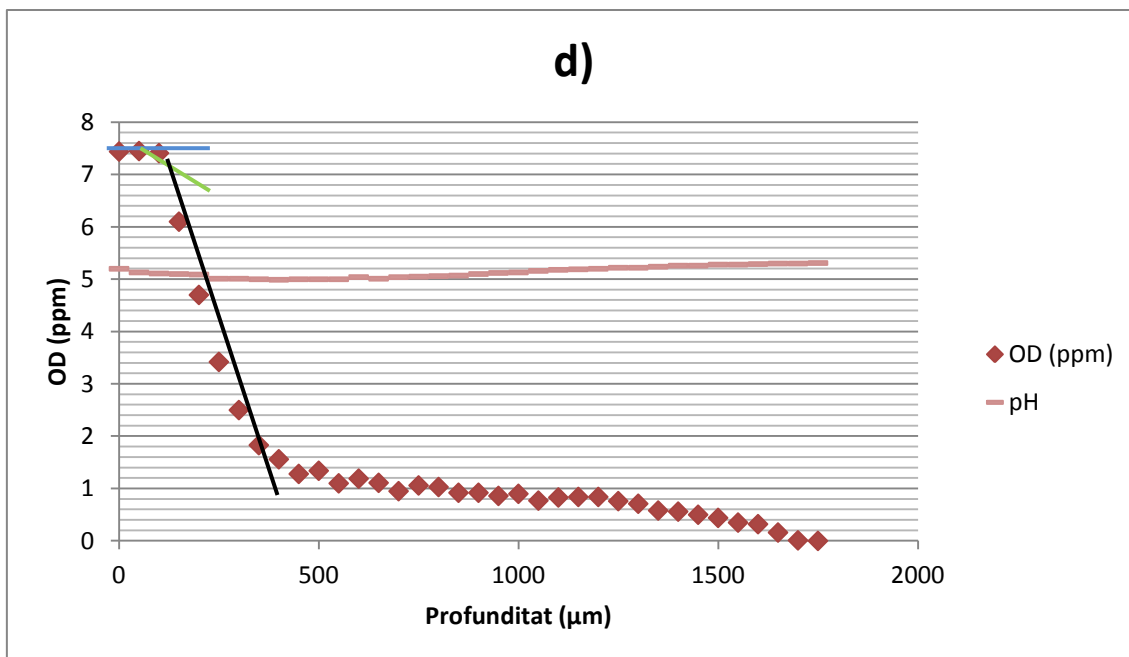
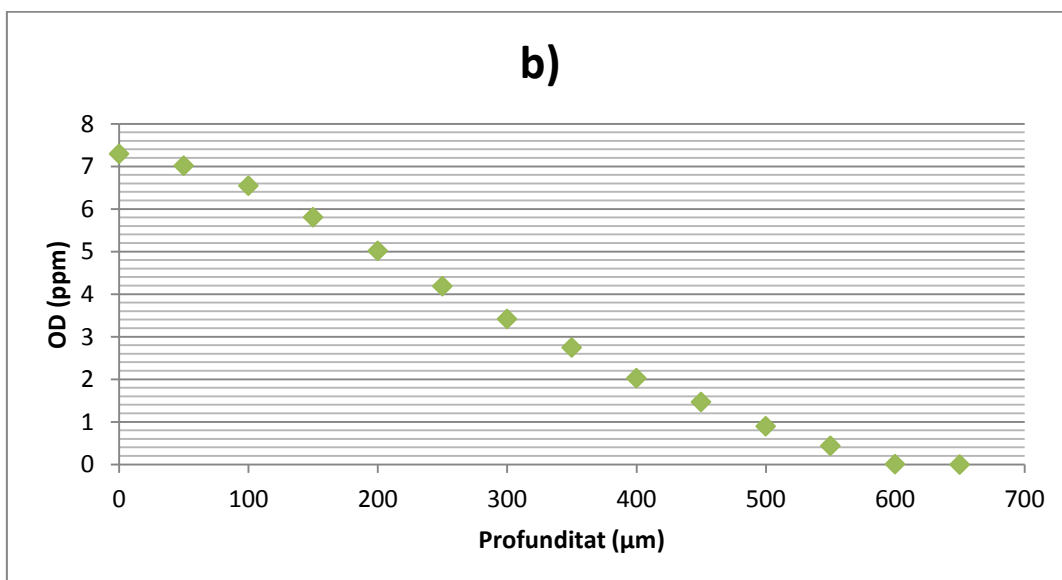
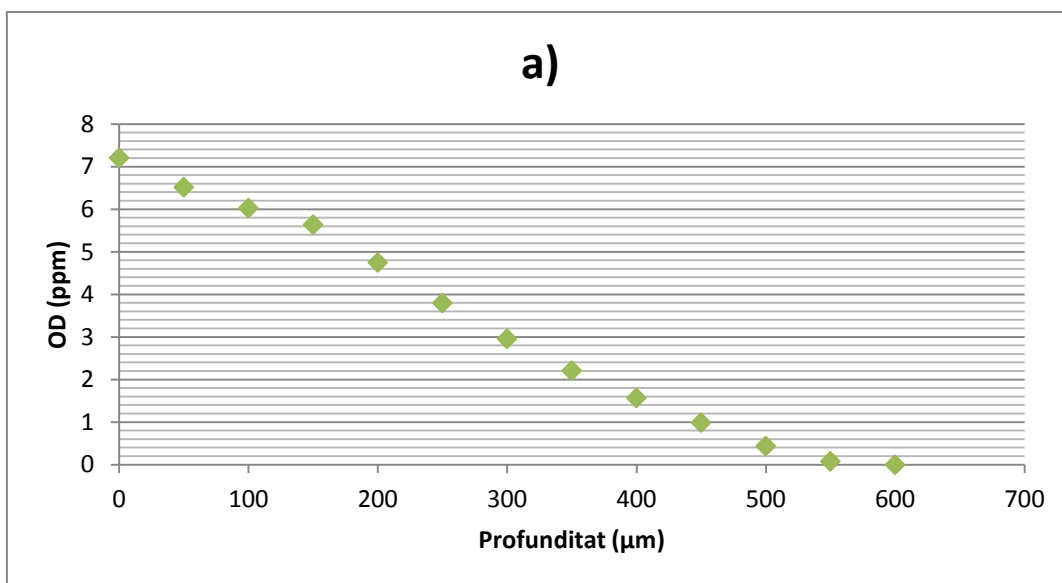


Figura 57. Gràfic del perfil mitjançant els microsensores Clark de la biopel·lícula amb 12 g/l de glucosa com a substrat en el dia 28 d'experimentació. El gràfic està diferenciat per 4 zones d'experimentació, la Figura 57. a) representa a la secció 1, la Figura 57. b) representa a la secció 2, la Figura 57. c) representa a la secció 3 i per finalitzar la Figura 57. d) representa la secció 4. Es detalla la zona líquida amb una línia blava, la interfase amb una línia verda i la zona de biopel·lícula aeròbia amb la negra.

Apèndix 2: Perfils per a la determinació de la biopel·lícula aeròbia

En aquest apartat podrem veure alguns exemples d'experimentacions realitzats per poder comparar valors i utilitzar-los posteriorment per modelitzar el sistema.

Grafiquem la zona aeròbia de la biopel·lícula dels perfils realitzats el dia 6 d'experimentació en condicions endògenes on la profunditat està en l'eix abscisses i l'oxigen dissolt en l'eix d'ordenades:



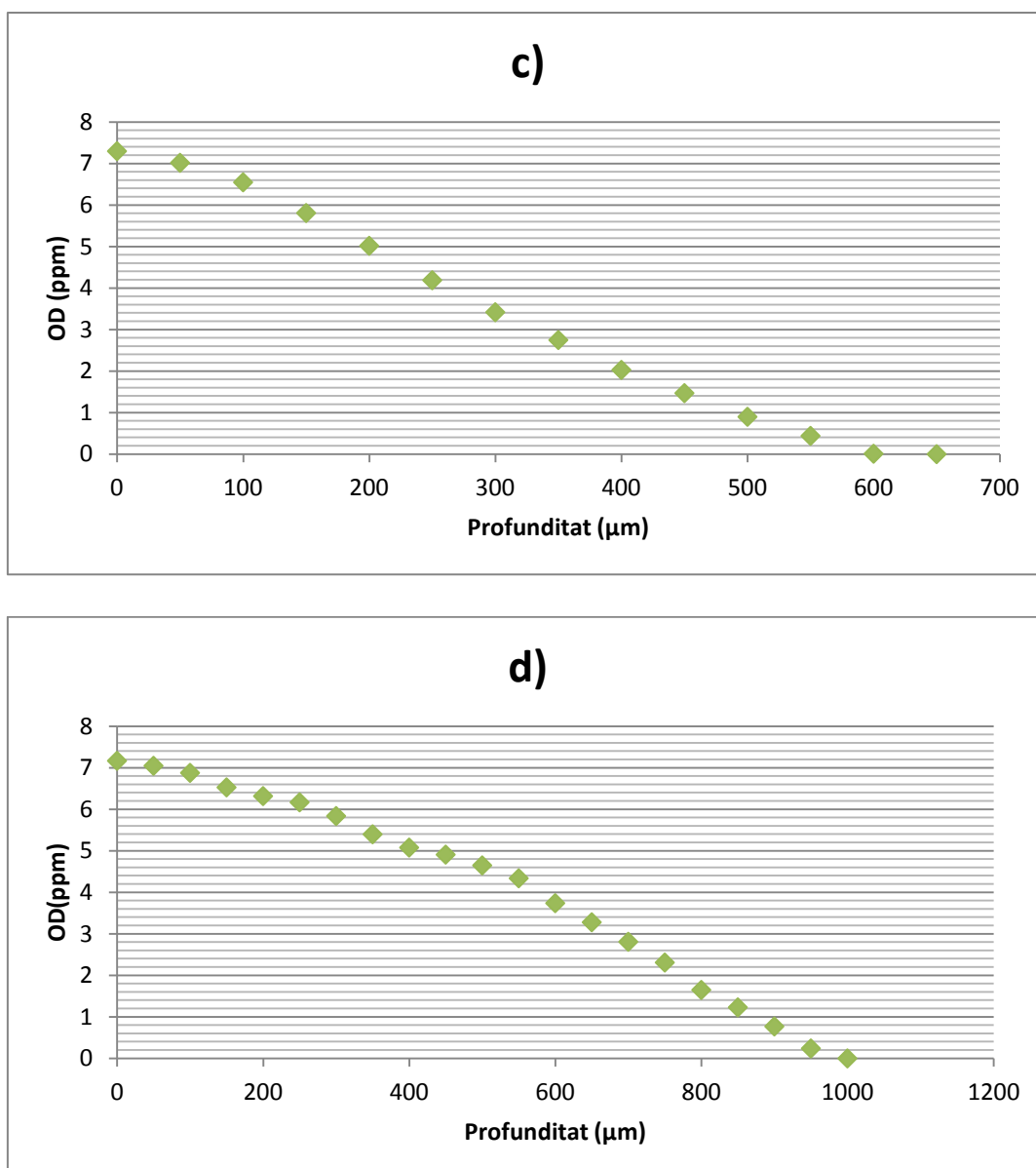
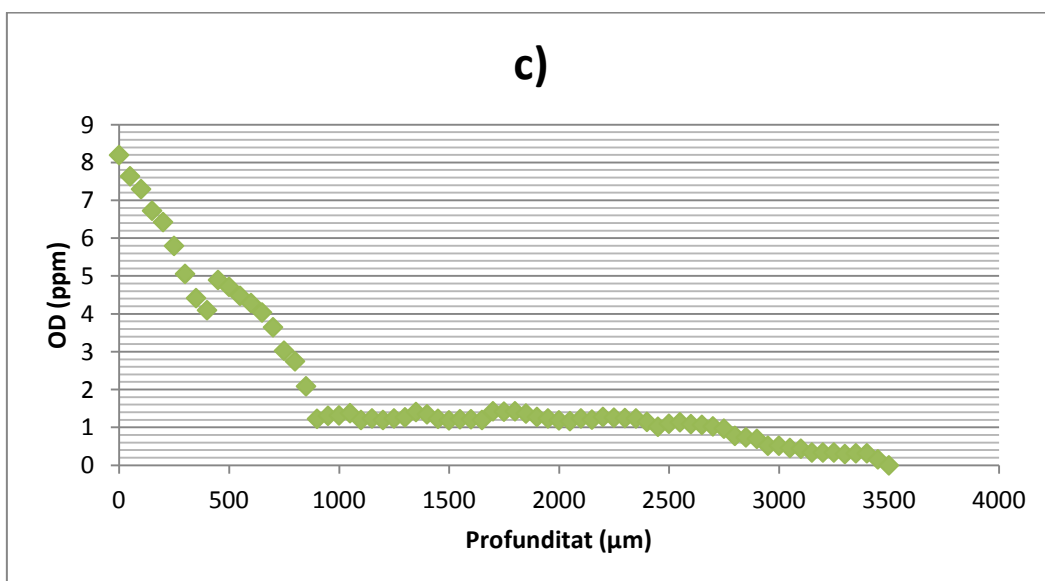
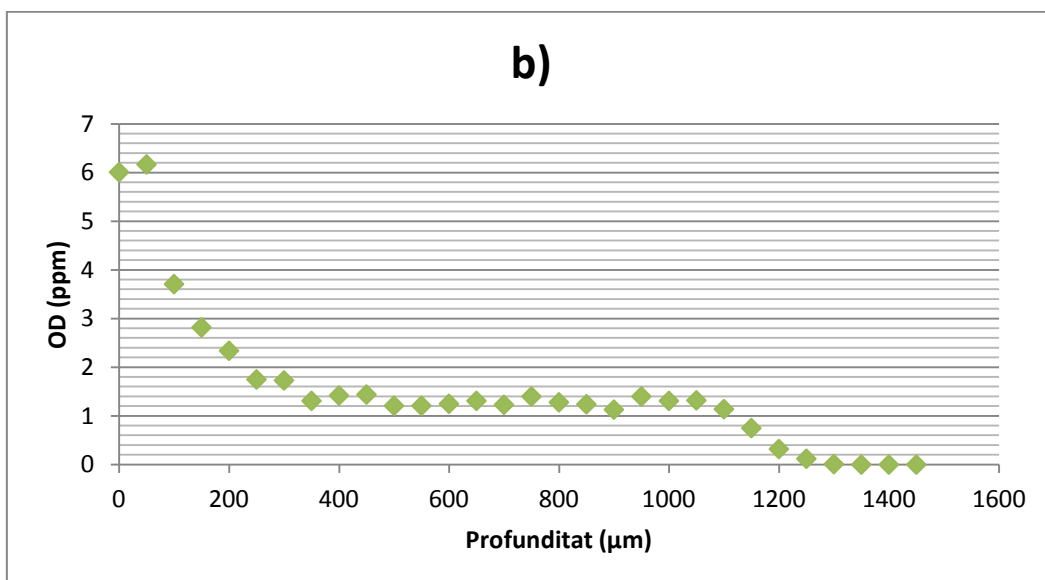
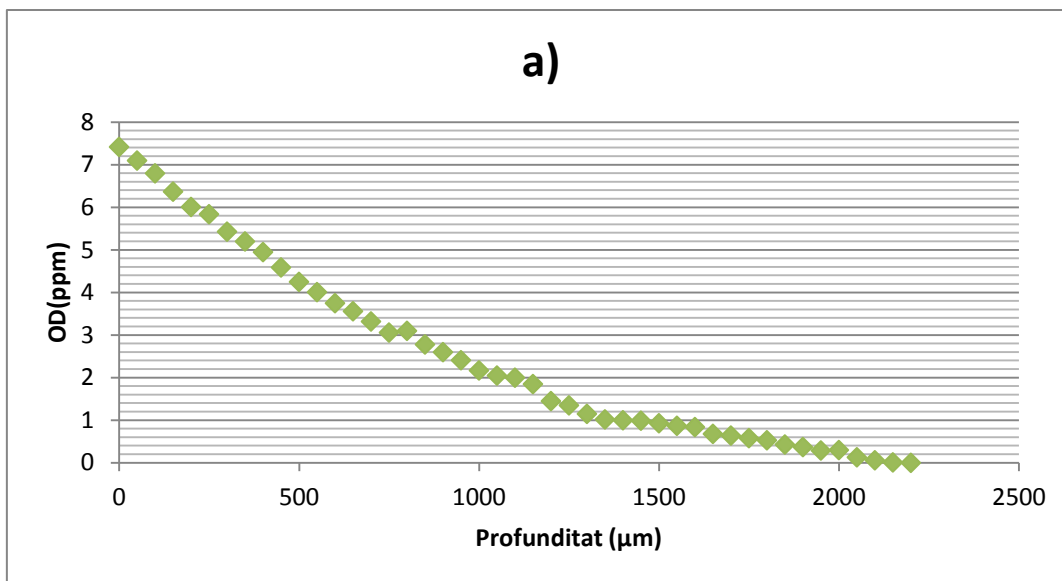


Figura 58. Zona aeròbia de la biopel·lícula dels perfils realitzats el dia 6 d'experimentació en condicions endògenes. En aquest gràfic es mostren les diferents seccions diferenciades en el reactor de la següent forma, la secció 1 és representada per la Figura 58. a), la secció 2 per la Figura 58. b), la secció 3 per la Figura 58. c) i finalment la secció 4 per la Figura 58. d).

A continuació com que tots els gràfics són molt semblants en la seva tendència, el que farem serà mostrar un on es vegin diferències amb el primer cas i a més estigui en condicions diferents. Grafiquem l'experiment del dia 28 on es va subministrar 12 g/l de glucosa.



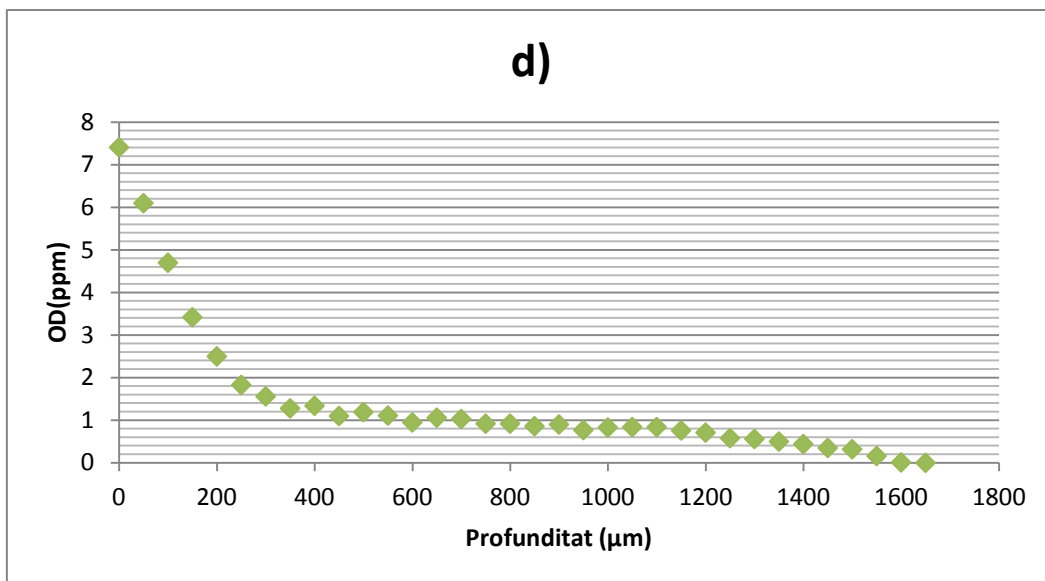
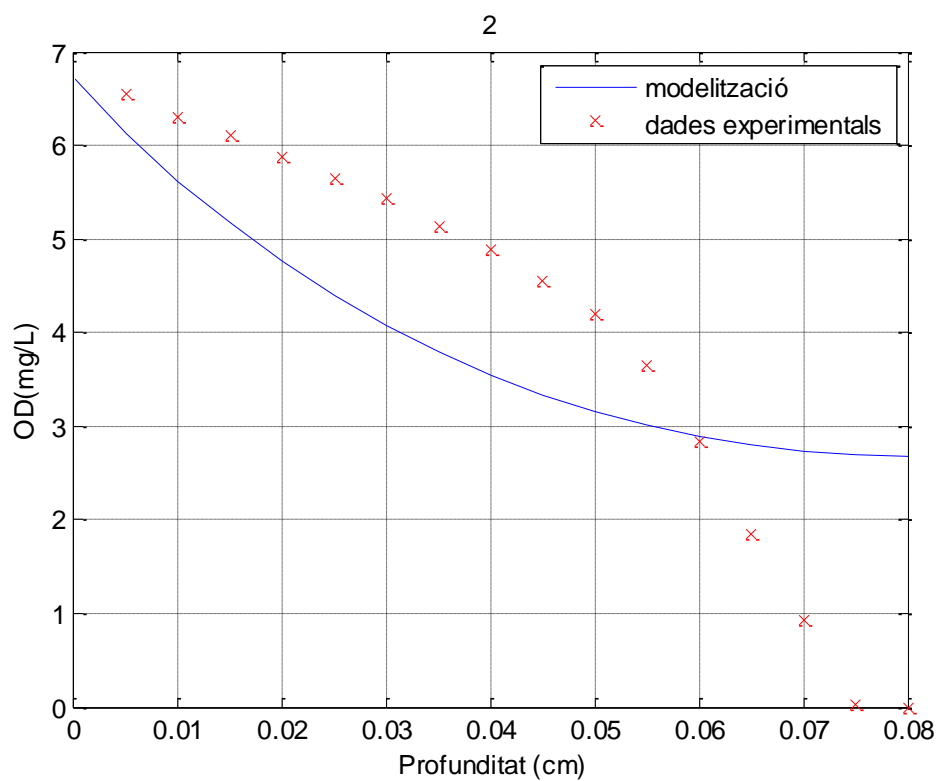
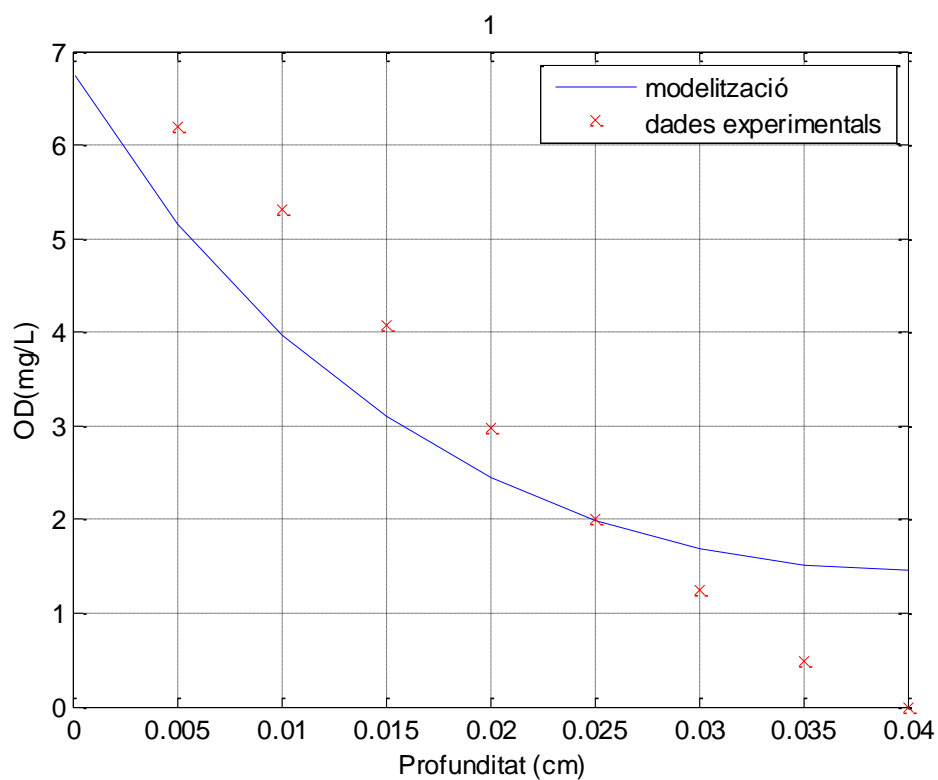


Figura 59. Zona aeròbia de la biopel·lícula dels perfils realitzats el dia 28 d'experimentació amb alimentació de substrat de 12 g/l de glucosa. En aquest gràfic es mostren les diferents seccions diferenciades en el reactor de la següent forma, la secció 1 és representada per la Figura 59. a), la secció 2 per la Figura 59. b), la secció 3 per la Figura 59. c) i finalment la secció 4 per la Figura 59. d).

Apèndix 3: Models de l'activitat de la biopel·lícula

En aquest apartat podem trobar la resta de models que no hem posat en el treball, obtinguts a partir del programa creat amb el Matlab:



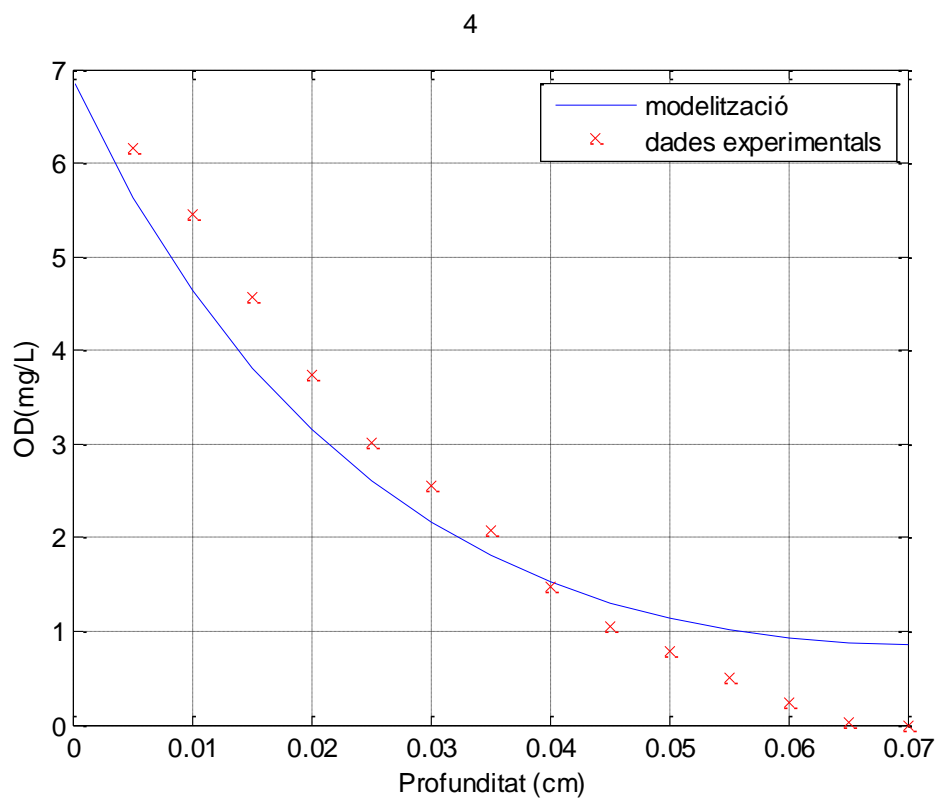
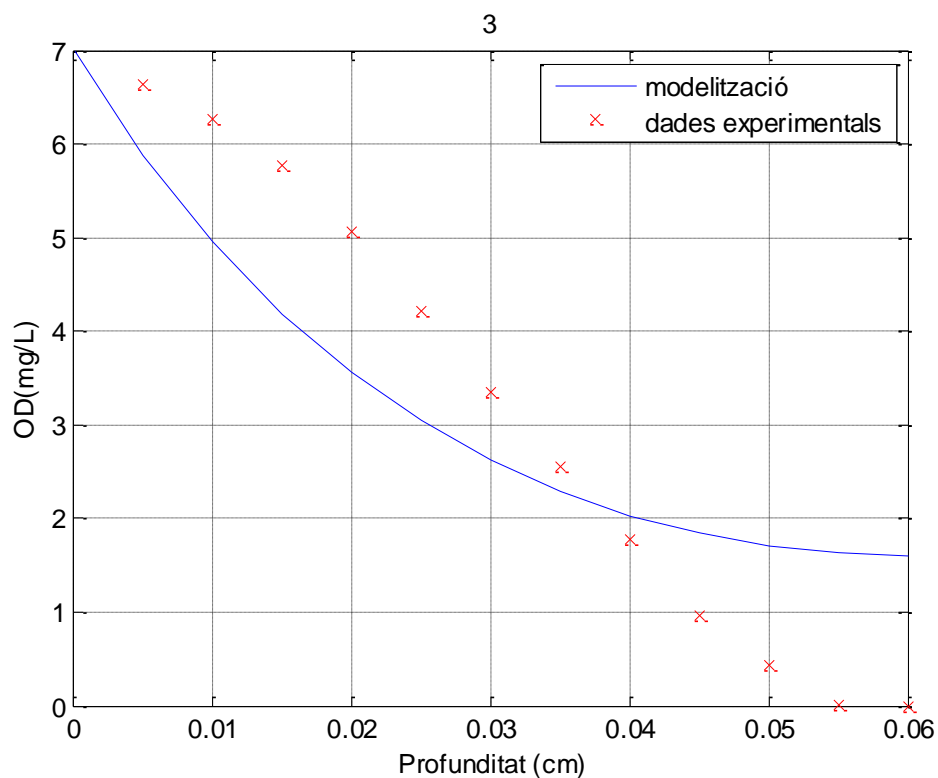


Figura 60. Modelització mitjançant el programa Matlab realitzant simulacions de l'activitat metabòlica a partir de les dades experimentals de cada secció en el bioreactor. La secció 1 és representada per la Figura 60. 1, la secció 2 és representada per la Figura 60. 2, la secció 3 és representada per la Figura 60. 3, la secció 4 és representada per la Figura 60. 4.

Apèndix 4: Taules per a la caracterització del sistema

Taula 6. Determinació de l'activitat metabòlica del model dels experiments diaris.

Activitat Metabòlica (mg/l)					
<i>Experiments Diaris</i>	Secció 1	Secció 2	Secció 3	Secció 4	Glucosa (g/l)
1	0.0305	0.0038	0.0129	1.57E-02	0
2	-	-	-	-	0
3	-	-	-	-	0
4	-	-	-	-	0
5	0.0175	0.0135	0.0176	1.14E-02	0
6	0.0149	0.0123	0.0123	3.00E-03	0
7	0.0204	0.0319	0.0325	1.43E-02	0
8	0.0485	0.0181	0.0106	7.30E-03	12
9	-	-	-	-	12
10	-	-	-	-	12
11	0.0536	0.0293	0.0307	1.17E-02	12
12	-	-	-	-	0
13	0.0076	0.0209	0.0033	1.26E-03	0
14	0.0113	0.0084	0.0051	0.0072	0
15	-	-	-	-	12
16	-	-	-	-	12
17	-	-	-	-	12
18	-	-	-	-	12
19	0.0142	0.3157	0.0045	0.0352	12
20	-	-	-	-	12
21	0.0142	0.0622	0.0065	0.003	12
22	0.0036	0.0055	0.0126	0.0037	0
23	-	-	-	-	0
24	-	-	-	-	0
25	-	-	-	-	0
26	0.0006	0.0006	0.0005	0.0017	0
27	0.0018	0.0093	0.0016	0.0182	12
28	0.0043	0.0131	0.0087	0.0449	26
29	-	-	-	-	26
30	-	-	-	-	26
31	-	-	-	-	26
32	0.0167	0.0161	0.0063	0.0031	26

33	-	-	-	-	26
34	0.0031	0.0025	0.0010	0.0025	26
35	0.0031	0.0025	0.0106	0.0059	26

Taula 7. Determinació de la profunditat aeròbia de la biopel·lícula segons els substrat subministrat.

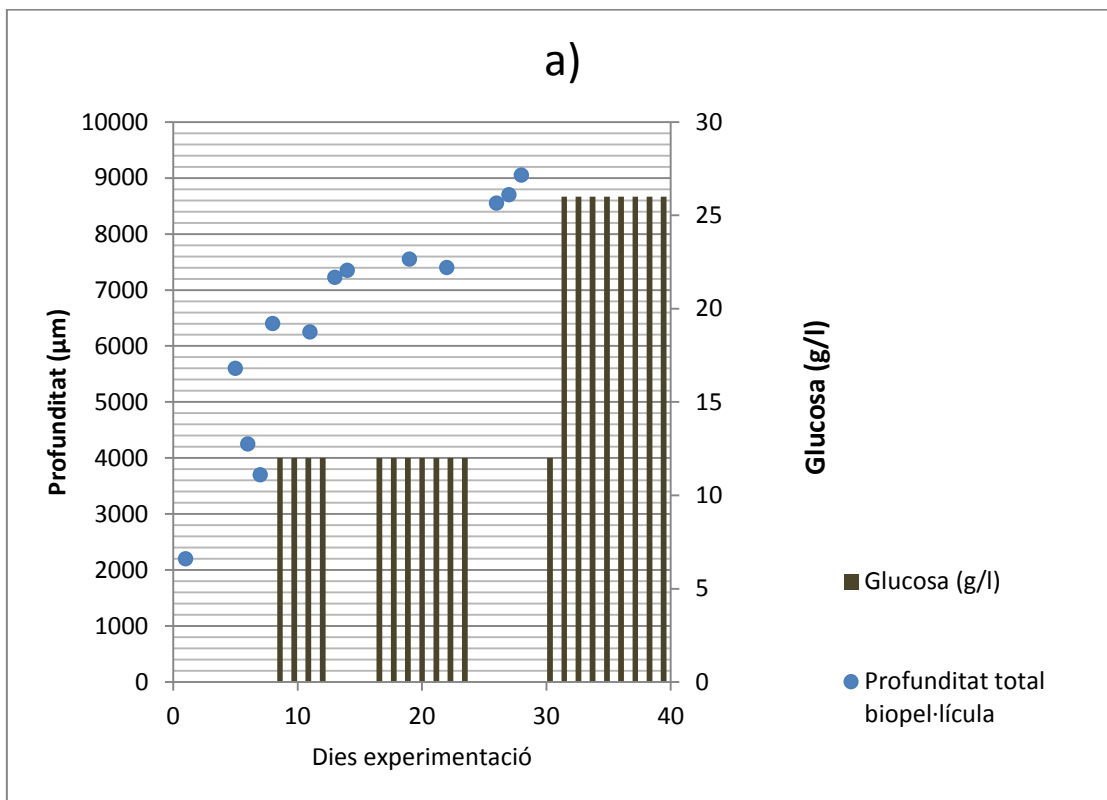
Biopel·lícula aeròbia del biofilm (μm)					
	Secció 1	Secció 2	Secció 3	Secció 4	Glucosa (g/l)
1	400	800	600	700	0
2					
3					
4					
5	500	500	450	550	0
6	600	650	650	1000	0
7	600	650	400	400	0
8	425	825	800	1250	12
9					12
10					12
11	425	525	625	1275	12
12					0
13	1850	625	2550	2900	0
14	2200	1250	1350	1600	0
15					12
16					12
17					12
18					12
19	1950	500	1800	1450	12
20					12
21	750	350	1300	1850	12
22	1550	1150	1100	2850	0
23					0
24					0
25					0
26	2650	2850	3350	1500	0
27	2200	1350	3500	1650	12
28	2750	2150	2250	1450	26
29					26
30					26
31					26
32	1400	800	1500	1400	26
33					26
34	1350	1900	3150	2350	26
35	1350	1900	1200	2200	26

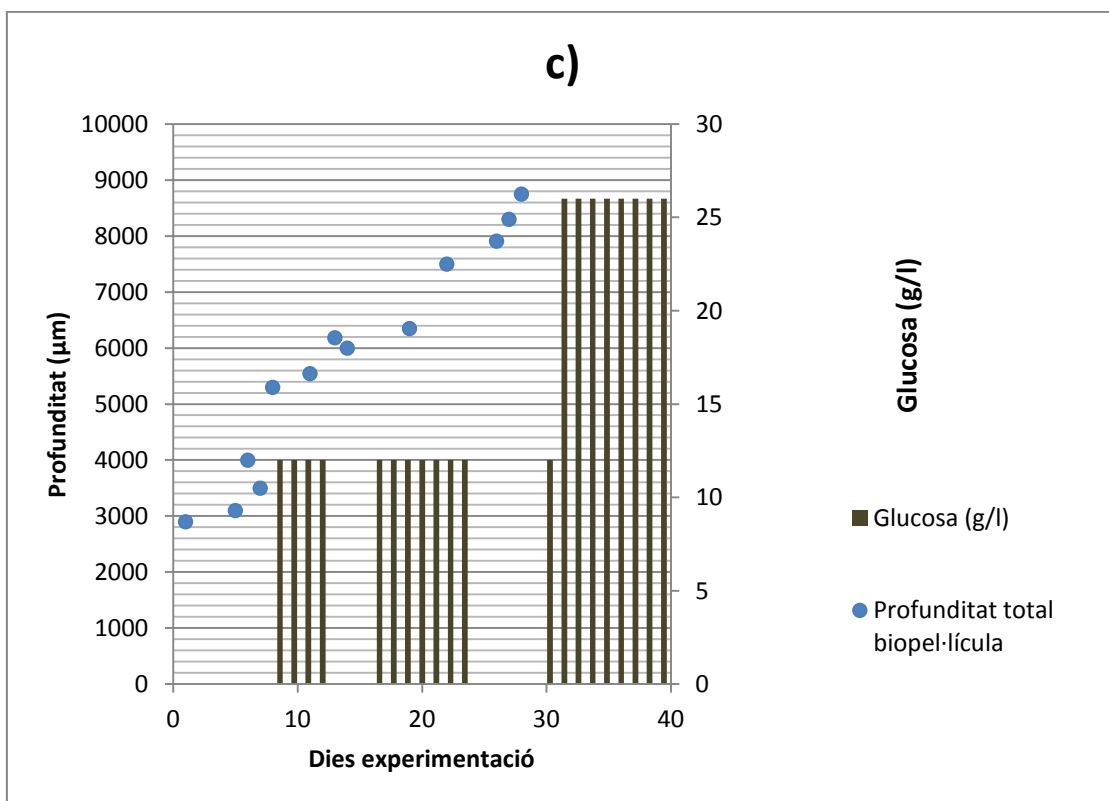
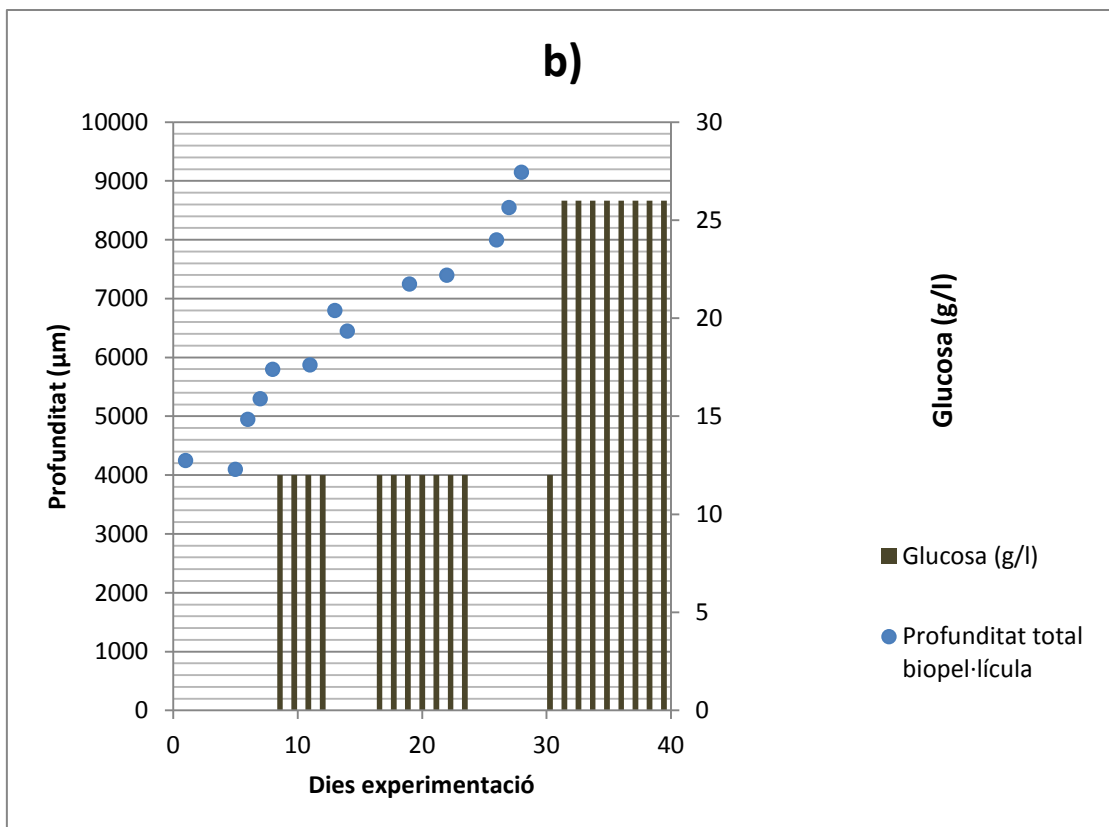
Taula 8. Taula on està determinat el gruix total de la biopel·lícula junt amb les dies d'experimentació i la glucosa subministrada.

Experiments	Dia	Biopel·lícula total (μm)				Glucosa (g/l)
		Secció 1	Secció 2	Secció 3	Secció 4	
1	1	2200	4250	2900	4300	0
	2					
	3					
	4					
2	5	5600	4100	3100	3150	0
3	6	4250	4950	4000	4700	0
4	7	3700	5300	3500	3450	0
5	8	6400	5800	5300	5750	12
	9					12
	10					12
6	11	6250	5875	5545	5700	12
	12					0
7	13	7225	6800	6185	6850	0
8	14	7350	6450	6000	6300	0
	15					12
	16					12
	17					12
	18					12
9	19	7550	7250	6350	7200	12
	20					12
11	21					12
12	22	7400	7400	7500	6250	0
	23					0
	24					0
	25					0
13	26	8550	8000	7910	7650	0
14	27	8700	8550	8300	8200	12
15	28	9050	9150	8750	8800	26
	29					26
	30					26
	31					26
16	32					26
	33					26
17	34					26
18	35					26

Apèndix 5: Gràfics de la profunditat total

En el següent apartat trobem els gràfics obtinguts de comparat totes les seccions amb tots els dies d'experimentació. On s'observa l'evolució de la biopel·lícula junt amb la quantitat de substrat que se li ha subministrat periòdicament.





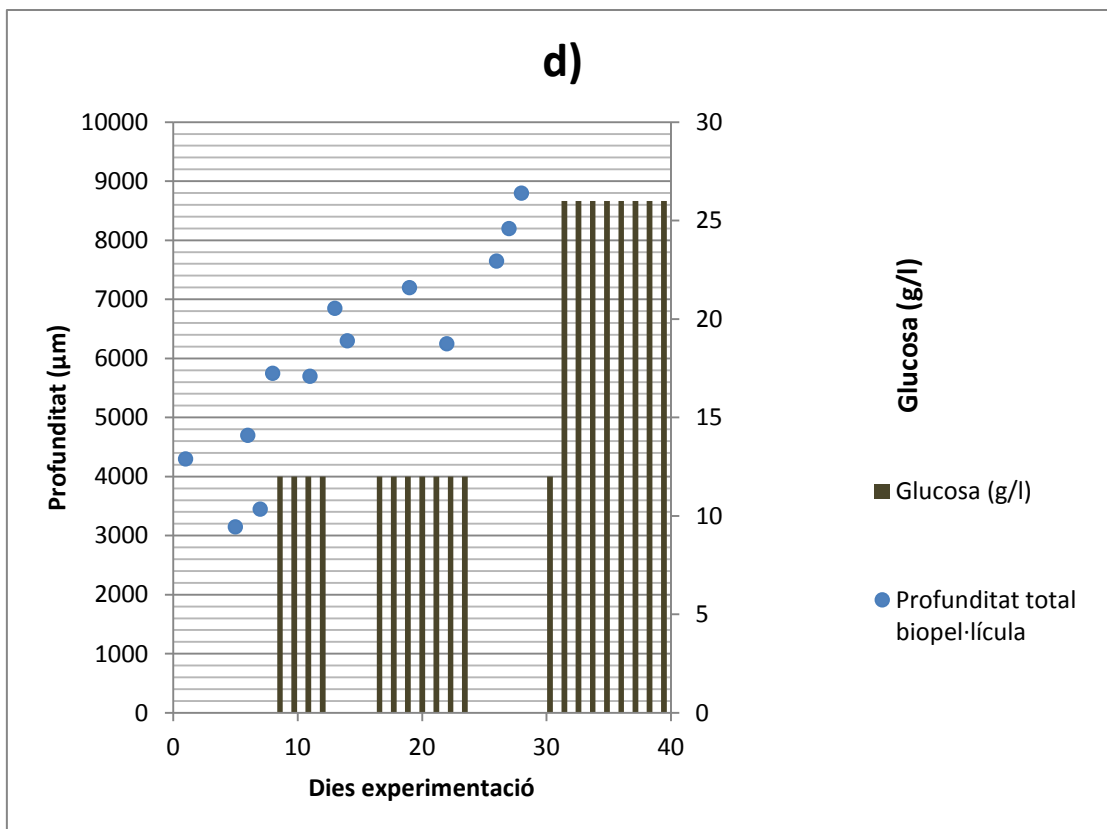
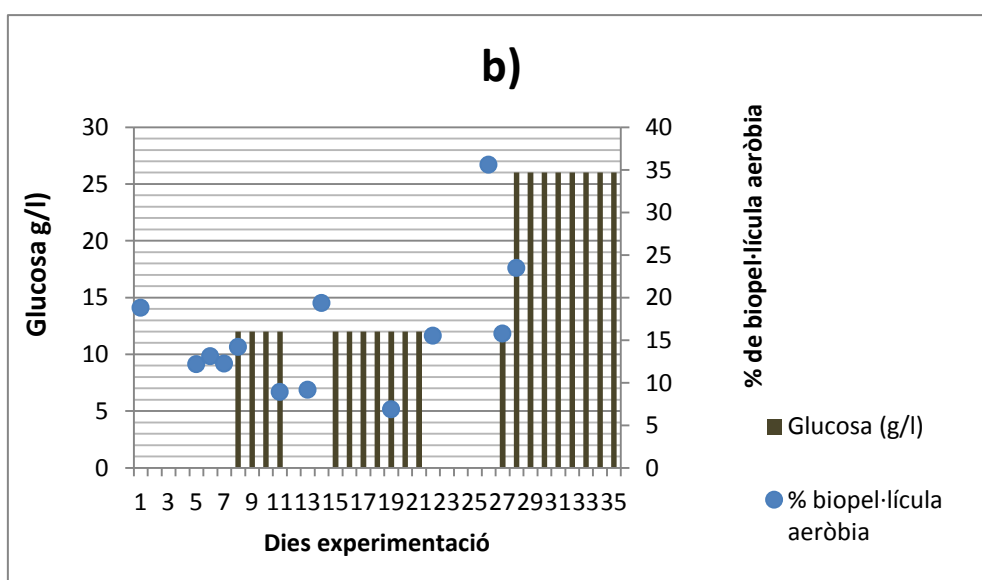
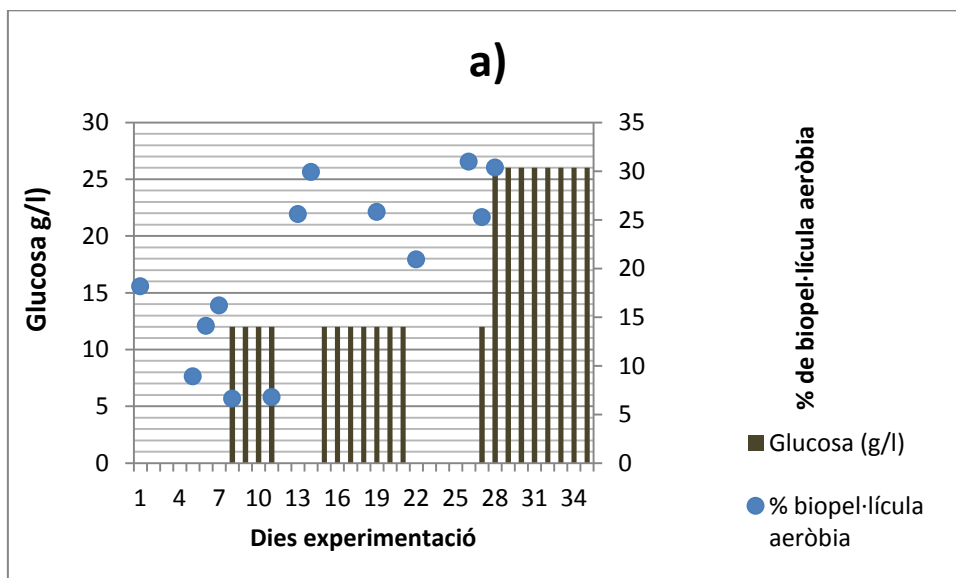


Figura 61. Determinació de la profunditat total de la biopel·lícula per seccions segons el substrat i els dies d'experimentació. En aquest gràfic es mostren les diferents seccions diferenciades en el reactor de la següent forma, la secció 1 és representada per la Figura 61. a), la secció 2 per la Figura 61. b), la secció 3 per la Figura 61. c) i finalment la secció 4 per la Figura 61. d).

Apèndix 6: Gràfics del percentatge del gruix aeròbic de la biopel·lícula

En el següent apartat trobem els gràfics obtinguts de comparat totes les seccions amb tots els dies d'experimentació. On s'observa l'evolució de la biopel·lícula aeròbia junt amb la quantitat de substrat que se li ha subministrat periòdicament.



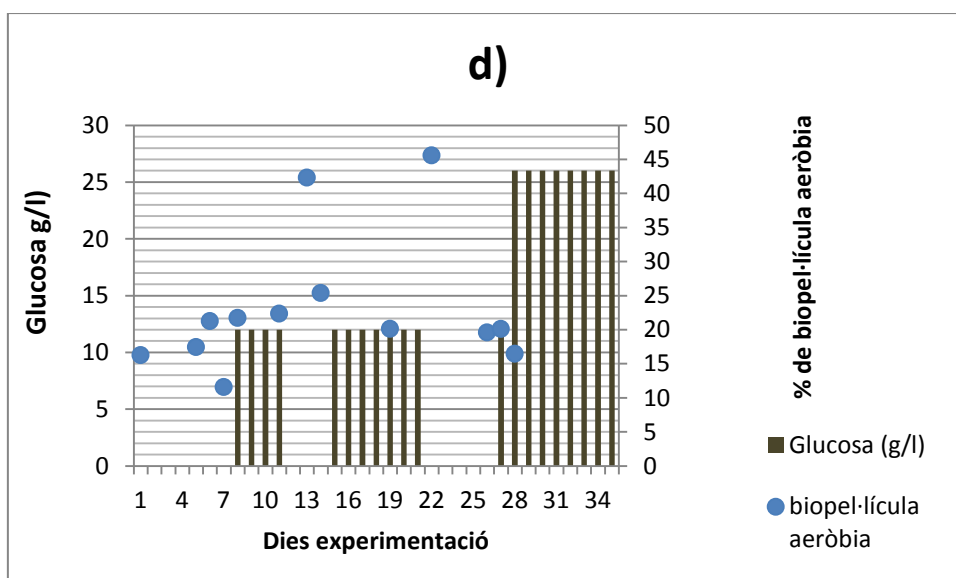
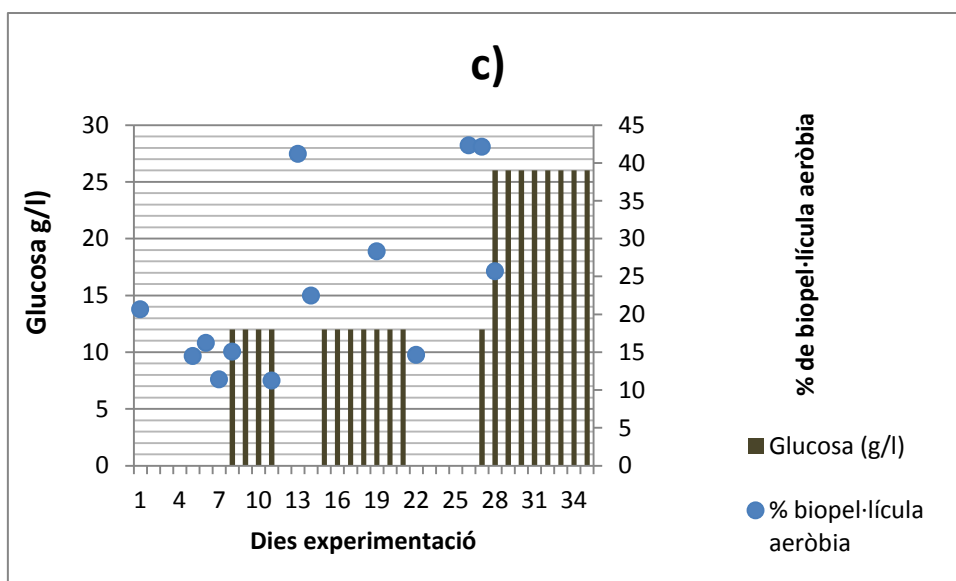
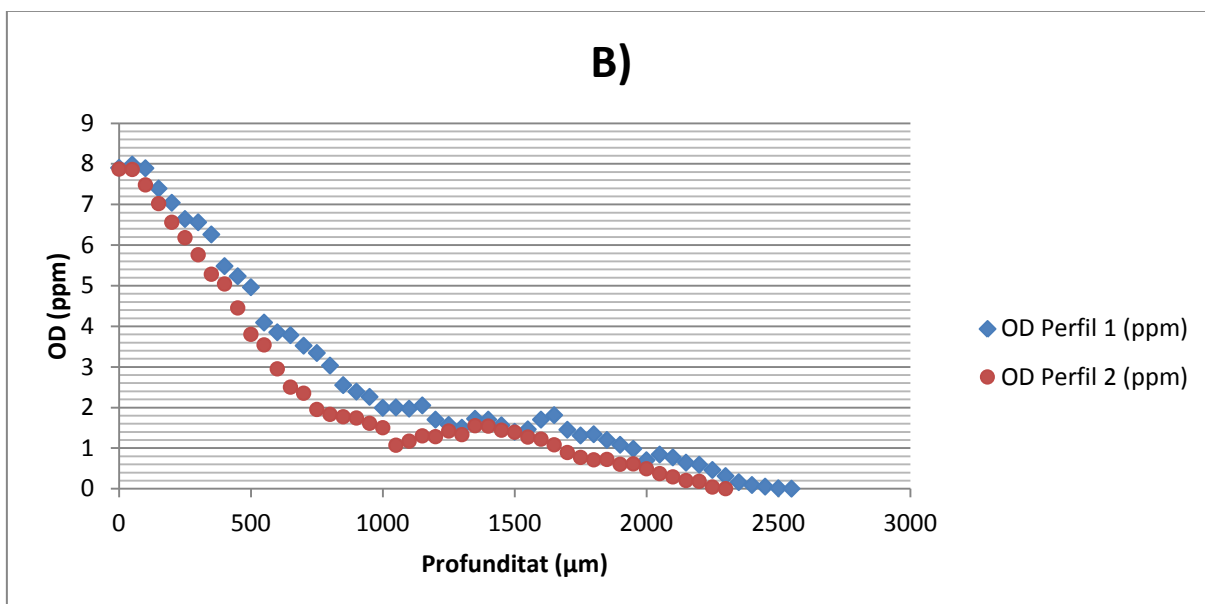
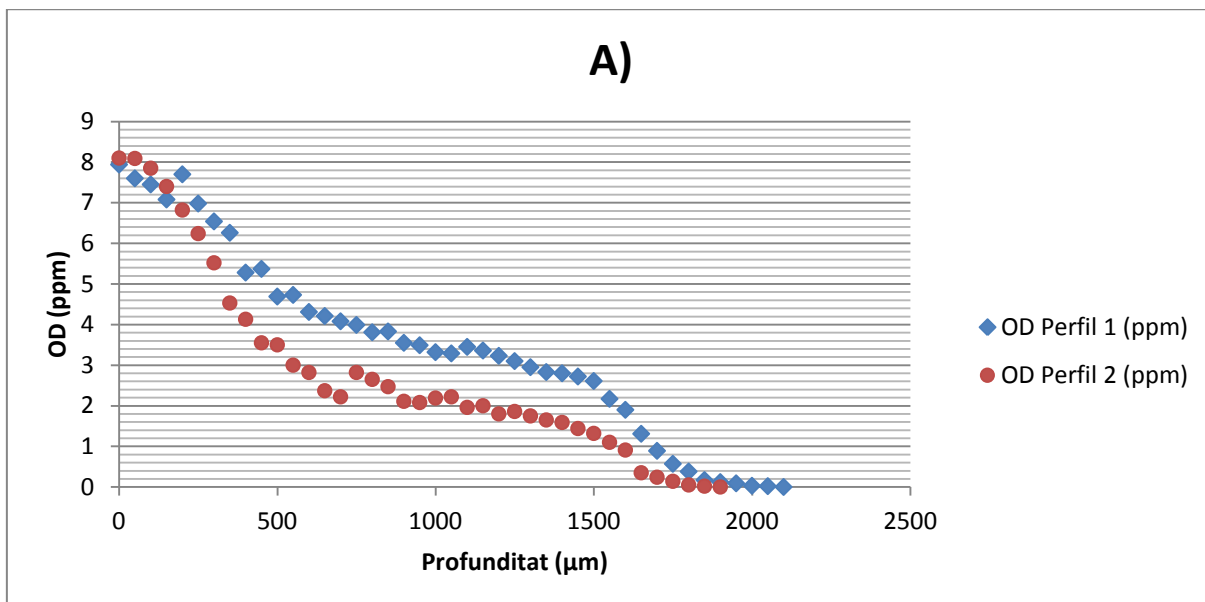


Figura 62. Determinació del % de profunditat aeròbia de la biopel·lícula per seccions segons el substrat i els dies d'experimentació. En aquest gràfic es mostren les diferents seccions diferenciades en el reactor de la següent forma, la secció 1 és representada per la Figura 62. a), la secció 2 per la Figura 62. b), la secció 3 per la Figura 62. c) i finalment la secció 4 per la Figura 62. d).

Apèndix 7: Perfils realitzat per a l'estudi cinètic

En el següent apartat trobem els gràfics obtinguts al realitzar perfils en tres punts localitzables de la biopel·lícula com s'ha detallat en la part de la memòria. On s'observen els dos perfils realitzats en el mateix punt que ens serviran per posteriorment obtenir la corba de la OUR.



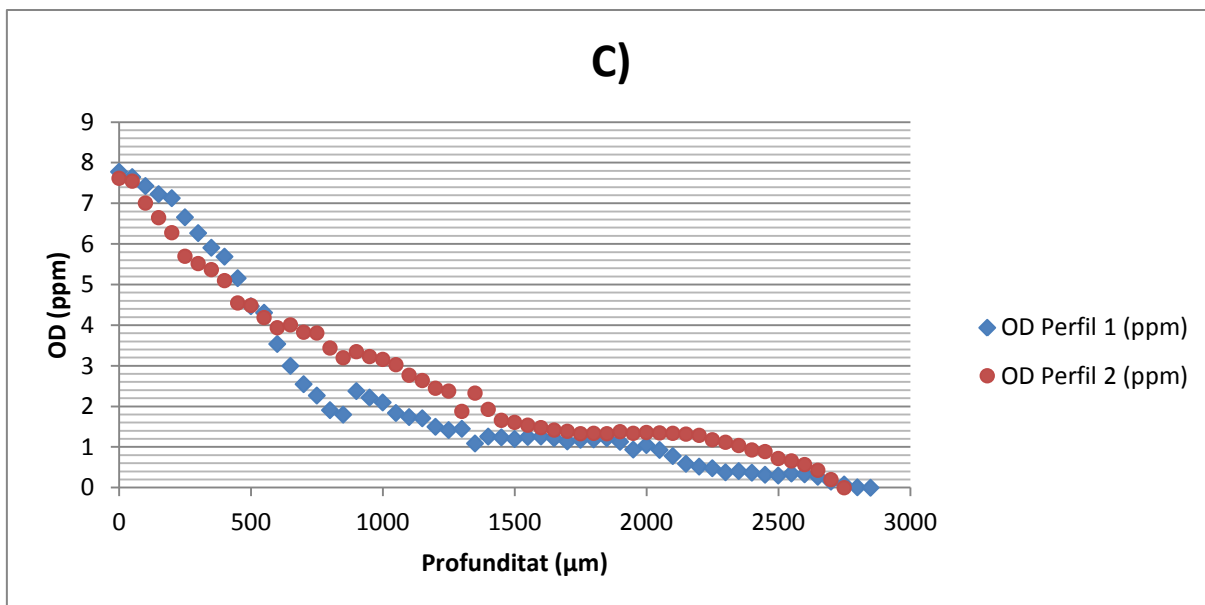


Figura 63 Gràficació de la recta de consum d'oxigen a diferents punts. Aquest conjunt de gràfics està format per la representació de tres punts, on en cada un es van realitzar dos perfils. La Figura 63. A) representa al punt 1, la Figura 63. B) al punt 2 i la Figura 63. C) al punt 3, tots amb substrat 2 g/l de glucosa.

Apèndix 8: Calibratge de bombes

En aquest apèndix es poden veure quina relació de cabals tenen les dos bombes del nostre sistema:

Glison Talla 16:

Taula 9. Relació de cabals de la bomba Glison Talla 16

rpm	Q_L
48	32.43
40	27.9
30	20.68
20	13.79
15	10.08
10	6.31
5	3.93
1	1.79

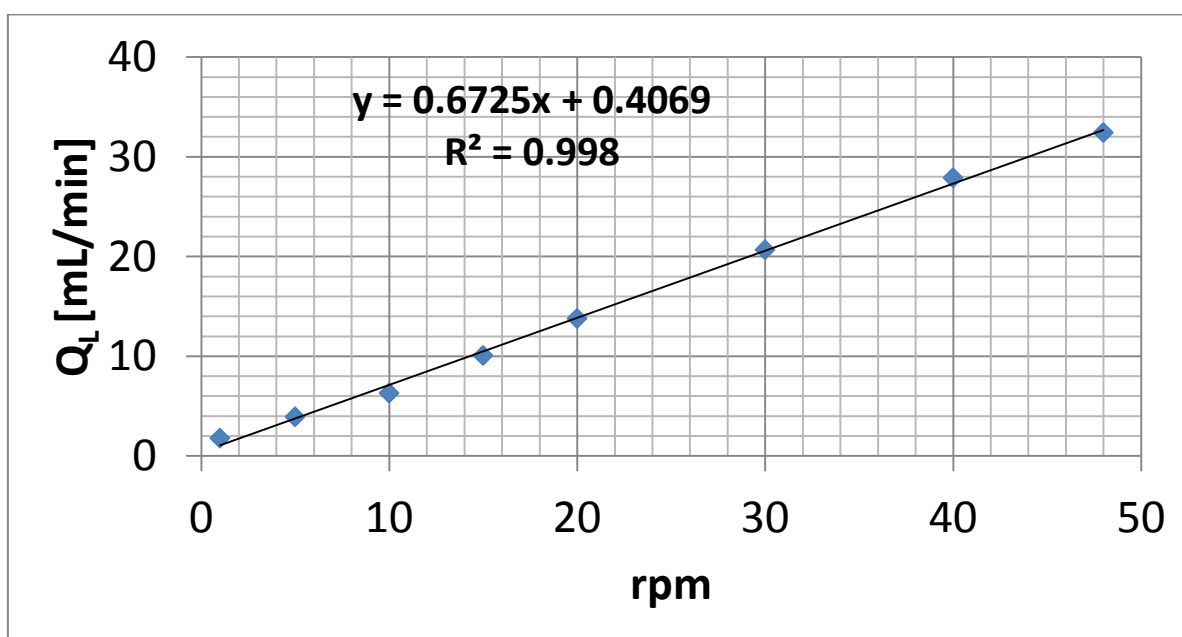


Figura 64. . Gràfic de la relació de cabals de la bomba Glison Talla 16 amb les rpm.

Glison Talla 13:

Taula 10. Relació de la bomba Glison Talla 13.

rpm	Q _L
48	3.42
40	3.07
30	2.11
20	1.46
15	1.05
10	0.79

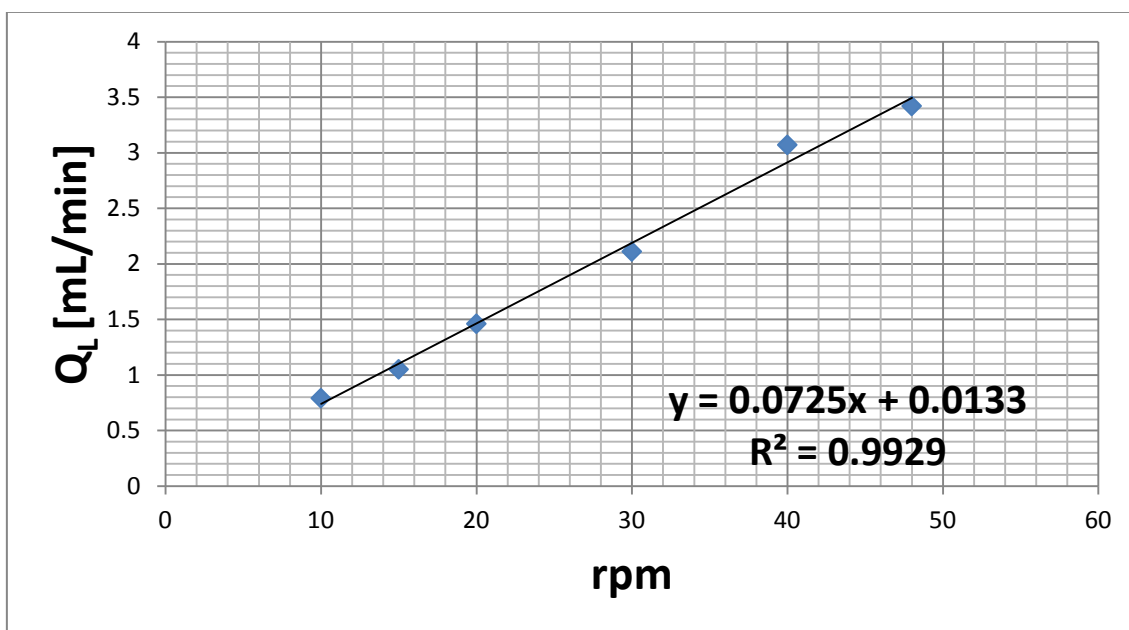


Figura 65. Gràfic de la relació de cabals de la bomba Glison Talla 13 amb les rpm.